АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XXII. ВЫП. 4

ИЮЛЬ — АВГУСТ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1953

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
26 NOV 1953

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор чл.-корр. АН СССР А. А. Имшенецкий

Секретарь Я. И. Раутенштейн

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Н. Д. Иерусалимский, Н. А. Красильников,
Е. Н. Мишустин, К. И. Рудаков, М. В. Федоров,
В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ «МИКРОБИОЛОГИЯ» ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2 КОНТОРА «АКАДЕМКНИГА»

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14. Издательство Академии наук СССР,
редакция журнала «Микробиология»

В. Л. ОМЕЛЯНСКИЙ

ПАМЯТИ В. Л. ОМЕЛЯНСКОГО

21 апреля 1953 г. исполнилось 25 лет со дня смерти выдающегося отечественного микробиолога Василия Леонидовича Омелянского. Четверть века назад советский период развития микробиологии только начинался. За последние 25 лет наша специальность не только бурно развилась, но ее связь с практикой, с народным хозяйством стала исключительно тесной.

Этим достижениям нашей микробиологии мы в значительной мере обязаны В. Л. Омелянскому. Его творчество необычайно многогранно. Как талантливый экспериментатор, давший синтез морфологических и физиологических методов исследований, он в своих работах развивал оригинальное направление, созданное С. Н. Виноградским, которое было и остается блестящей страницей в истории отечественной микробиологии.

Широкий диапазон научных интересов В. Л. Омелянского привел к тому, что в самых различных областях микробиологии им были выполнены интересные работы. Им было написано руководство, на котором более 30 лет воспитываются микробиологи у нас в стране. Ни на одном языке мы не знаем курса микробиологии, так увлекательно изложенного и в то же время безупречного в научном отношении.

Заслуги В. Л. Омелянского в пропаганде и популяризации микробиологии исключительно велики. Блестящий стилист, прекрасный популяризатор, он сделал достижения микробиологии доступными для широких масс населения. Высокая общая культура и литературный талант позволили ему дать совершенные по форме и содержанию статьи и монографии по истории науки. Его интересы выходили за пределы своей специальности. В. Л. Омелянский был большим знатоком литературы и поэзии, любителем музыки, шахмат. Его перу принадлежат чисто беллетристические произведения, и, возможно, поэтому некоторые его научные монографии продолжают оставаться образцами и в литературном отношении. Большая скромность, деликатность, исключительная мягкость и личное обаяние привлекали всех к В. Л. Омелянскому.

Оценивая деятельность ученого через 25 лет после смерти, мало перечислить его наиболее важные экспериментальные исследования и выяснить их значение. Не менее существенно установить, в какой степени ученый обладал даром предвидения, в какой мере он мог наметить пути дальнейшего развития своей специальности.

В этом отношении многие мысли, высказанные В. Л. Омелянским, были подлинно новаторскими, они не могли быть оценены в достаточной мере современниками, но все последующее развитие микробиологии доказало их правильность. Его исследования по разложению муравьиной кислоты микробами особенно ценны сейчас, когда возрос интерес к роли монокарбоновых соединений в обмене веществ микроорганизмов. Образование метана бактериями, изучавшееся В. Л. Омелянским, привлекло внимание ряда исследователей, и в честь его один из микробов, образующих метан, был назван Баркером именем Омелянского. Большим «дерзанием» была попытка В. Л. Омелянского получить ферментативную (без участия размножающихся клеток) нитрификацию. Она была предпринята в тот период, когда, помимо лакказы, не было известно ни одной оксидазы. Однако самым выдающимся предвидением В. Л. Омелянского бесспорно следует считать способность микробов служить химическими

реактивами. Это направление в микробиологии, успехи которого были им так блестяще предсказаны, развилось в самостоятельную область практического применения микробов в самых различных областях науки и промышленности. Микроорганизмы, как необычайно чувствительные реактивы, применяются сейчас для обнаружения аминокислот, витаминов, микроэлементов, поисков местонахождения горючих газов и в ряде других случаев. Возможность такого применения была высказана в тот период, когда некоторые разделы физиологии микробов, например их витаминное питание, еще не существовали.

Успехи современной микробиологии исключительны, но всякий раз, когда мы говорим о них, надо вспоминать имя В. Л. Омелянского, заложившего фундамент здания советской общей микробиологии.

А. А. Имшенецкий

В. Л. ОМЕЛЯНСКИЙ. ЕГО ЖИЗНЬ И НАУЧНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

(Краткий очерк)

Л. Д. Штурм

Василий Леонидович Омелянский родился 26 февраля 1867 г. в Полтаве в семье учителя гимназии.

Отец Василия Леонидовича Омелянского — Леонид Николаевич Омелянский — преподавал греческий и латинский языки и древнюю историю, а впоследствии занимал должность директора Житомирской гимназии. Когда Василий Леонидович был в первом классе, вся семья переселилась в Житомир. Отец В. Л. Омелянского был высокообразованный человек, активный общественный деятель, пользовавшийся большой любовью и популярностью среди учащихся. Он был прекрасным музыкантом, и, повидимому, ему обязан Василий Леонидович своей любовью и глубоким пониманием музыки.

Мать Василия Леонидовича — Юлия Васильевна Омелянская — посвятила свою жизнь воспитанию детей.

О детских и юношеских годах Василия Леонидовича сохранились лишь скудные сведения. Известно только, что Василий Леонидович учился в Полтавской, Острожской и Житомирской гимназиях. В 1866 г. он окончил Житомирскую гимназию с серебряной медалью.

Василий Леонидович Омелянский с юных лет проявлял разносторонние способности. Он любил рисовать, писал с натуры. Его карандашные наброски отличались тонкостью рисунка. Эта способность оказала ему большую услугу в его дальнейшей работе.

Часы досуга В. Л. Омелянский охотно посвящал шахматам и в позднейшие годы жизни участвовал в шахматных турнирах, состязаясь с лучшими игроками того времени.

После окончания гимназии, в 1886 г., В. Л. Омелянский поступает на естественное отделение физико-математического факультета Петербургского университета. Среди других студентов того времени, по отзывам современников, В. Л. Омелянский выделялся своею серьезностью и стремлением к знаниям в различных областях науки. Он увлекался не только практическими занятиями и лекциями в области естествознания, но и литературой и философией. Особенно сильное впечатление производили на него лекции Д. И. Менделеева и Н. А. Меншуткина.

Н. А. Меншуткин обратил внимание на одаренного студента и предложил ему остаться при кафедре органической химии по окончании университета.

В 1890 г. В. Л. Омелянский окончил университет с дипломом первой степени и был оставлен на два года при кафедре органической химии.

Работая под руководством проф. Меншуткина, В. Л. Омелянский изучал влияние разбавления на скорость химических реакций и в 1892 г. опубликовал свою первую работу. Проф. Кистяковский дал высокую оценку этой работе.

Летом и осенью 1893 г. Василий Леонидович служил химиком на чугунолитейном частном заводе в Донской области (Сулин). О жизни Василия Леонидовича в Сулине красноречиво говорят его письма к

Николаю Александровичу Меншуткину и к Борису Николаевичу Меншуткину. Привожу отрывки из них.

В письме к Борису Николаевичу Меншуткину, датированному 15 августа 1899 г., Василий Леонидович пишет: «...Уже более трех месяцев, как я на заводе, время достаточное для того, чтобы ознакомиться с предстоящей деятельностью и с условиями. Моя обязанность, как химика, состоит в анализе сырых и переработанных заводских продуктов — руды, каменных углей (антрацитов преимущ.), флюсов (известняк, доломит и др.), чугуна, железа, шлаков и т. п. Лаборатория, в том виде, в каком я ее застал, помещалась в одной единственной комнате, небольшой, низкой и устроенной крайне антигигиенически...»

«...Живя постоянно среди узких заводских интересов, которые все время вертятся в круге заводских стен, невольно сам суживаешься и мельчаешь до неузнаваемости...»

«Но,— как писал М. Н. Красавицкий в статье об В. Л. Омелянском,— через несколько месяцев произошел совершенно неожиданный и счастливый поворот в жизни и научной деятельности Омелянского, определивший его истинное значение не только в отечественной, но и в мировой науке».

В декабре 1893 г. Василий Леонидович был приглашен на должность помощника заведывающего Отделом общей микробиологии Государственного института экспериментальной медицины.

Отдел общей микробиологии Государственного института экспериментальной медицины был организован С. Н. Виноградским в 1891 г. Первым сотрудником Виноградского был Н. В. Дьяконов, но в 1893 г. он вышел в отставку и вскоре умер. С. Н. Виноградский обратился к Н. А. Меншуткину с просьбой рекомендовать ему ассистента химика. «К своей рекомендации я отношусь очень серьезно, а потому позвольте подумать и выбрать»,— ответил Н. А. Меншуткин С. Н. Виноградскому. Через некоторое время Н. А. Меншуткин написал об этом В. Л. Омелянскому и предложил ему занять место ассистента у С. Н. Виноградского.

Василий Леонидович охотно принял предложение и в конце 1893 г. прибыл в Петербург.

Так началась научная жизнь Василия Леонидовича Омелянского.

В своих воспоминаниях об этой поре жизни В. Л. Омелянского С. Н. Виноградский пишет:

«В 1893 г., в один зимний вечер, насколько помню в первых числах ноября, я впервые увидел Василия Леонидовича, приехавшего с юга России и явившегося представиться мне в качестве моего будущего ассистента.

Мало есть людей на свете, у которых вся внешность — выражение лица, речь, смех, манеры, движения — так верно выражают внутреннего человека, как это было у Василия Леонидовича. Мягкий по натуре, спокойный, уравновешенный, благожелательный, прекрасно воспитанный молодой человек,— представилось мне сразу, и я не только не ошибся, а скорее недооценил... С первого момента и до последнего, в течение почти 35 лет, отношения наши сохраняли неизменно безоблачный характер. Как было со мной, так и с другими. И этот счастливый характер придавал личности покойного особенную прелесть. Он был живым примером того, как характер красит человека, совершенно независимо от его силы и способности.

Первая беседа коснулась, само собой разумеется, его обязанностей ассистента, будет ли он в силах их выполнять, так как он до сего занимался только химией, по микробиологии ничего не знает, в микроскоп заглядывать случалось, но с ним никогда как следует не работал...

Сомнения эти, простодушно и весело высказанные, легко было успокоить замечанием, что в его будущем положении микробиологическая мудрость придет сама собою, наглядным путем, и, надеюсь, так быстро,

что он и сам этого не заметит. Не знаю, заметит ли он, но сам-то я совершенно не заметил, как она к нему пришла.

Текущие лабораторные беседы и бывшие в его распоряжении пособия легко довели его до микробиологической зрелости в самый короткий срок. А лабораторные темы, технически трудные,— вроде нитрификации, несомненно, содействовали приобретению им технической сноровки.

Всякая техника, впрочем, давалась ему необычайно легко. На его манипуляции приятно было смотреть. Неслышно двигался он по лаборатории, незаметно и не торопясь вел химические операции или культуры, все это неизменно гладко, без напряжения и нервничания, без малейших инцидентов какого бы то ни было рода. Работа как-то незаметно спорилась в его руках, что, конечно, много содействовало развитию трудов молодой еще лаборатории. Достаточно указать на исследования по ассимиляции атмосферного азота, давшие с приходом Василия Леонидовича очень скоро определенный результат, благодаря выполненным им многочисленным и точным анализам».

Первое время В. Л. Омелянский принимал участие в работе С. Н. Виноградского по нитрификации и по фиксации свободного азота.

Об этой поре работ Отдела общей микробиологии, руководимого С. Н. Виноградским, Д. К. Заболотный пишет: «Я никогда не забуду того животворного научного влияния, которое чувствовалось в лаборатории».

Первая самостоятельная работа Василия Леонидовича посвящена процессу нитрификации («О нитрификации органического азота», 1889). В ней разрешается вопрос о том, могут ли нитрифицирующие бактерии «направлять свою окислительную работу непосредственно на азот органического вещества или их роль в общем круговороте азота ограничена окислением аммиака в азотистую и далее в азотную кислоту».

Полученные данные вполне подтвердили теоретические представления и исследования С. Н. Виноградского о свойствах нитрифицирующих бактерий и о роли процесса нитрификации в природе.

Результаты работы резюмированы следующим образом.

1) «Нитрификация органического азота не происходит при действии чистых культур нитрифицирующих микробов. Эти организмы совершенно лишены способности разлагать азотистые органические вещества, отщепляя аммиак, или же воздействовать непосредственно на азот сложной органической частицы, окисляя его.

2) Для нитрификации органического азота необходимо, чтобы он был предварительно минерализован, т е. превращен в форму аммиака, а для этого требуется участие по крайней мере еще одного микроба, который разлагал бы органическое вещество с образованием аммиака».

В конце работы приводится замечательная по ясности схема процесса нитрификации в природе и указывается роль в нем различных видов бактерий. Следует отметить, что воззрения С. Н. Виноградского и В. Л. Омелянского на нитрификацию разделялись в то время далеко не всеми исследователями, как и не всеми разделяются в настоящее время.

Неспособность нитрифицирующих бактерий использовать азот органических соединений оспаривалась многими авторами, и приводились данные, указывающие обратное. Большую сенсацию вызвали работы Боннской опытной станции (Штутцер, 1896—1898). Однако результаты работы Штутцера, как выяснила проверка культур, оказались ошибочными и объяснялись техническими трудностями, связанными с выделением культуры. «Плеоморфизм культуры оказался простым загрязнением»,— подводит итоги этим работам Василий Леонидович, и с блестящим остроумием подвергает он беспощадной критике эти исследования.

Вторая работа В. Л. Омелянского, опубликованная в том же году (1889), посвящена методике выделения нитрифицирующих бактерий из почвы.

Работа эта в то время вызывалась настоятельной необходимостью, так как технические трудности выделения нитрифицирующих бактерий приводили к ошибочным взглядам на физиологию этих микроорганизмов. «Вследствие этих трудностей,— пишет Василий Леонидович,— некоторым авторам приходилось работать с не чистым материалом, не сознавая этого, и приписывать тому или другому из нитрифицирующих организмов коллективные свойства той смеси микробов, которая случайно поселилась в их культурах» (1899).

Приступая к работе, Василий Леонидович не ограничивается только критическим рассмотрением предложенных ранее методов, но подвергает их тщательной экспериментальной проверке.

Эти исследования приводят его к заключению, что метод разведения (Франкланд, 1890) и метод отрицательных пластинок (Виноградский, 1890) «в методическом отношении весьма слабы и не могут быть рекомендованы, как прием для изолирования микробов нитрификации». К этому выводу пришел также и С. Н. Виноградский.

Далее он переходит к методу культивирования нитрифицирующих бактерий на кремнекислом геле; Василий Леонидович подробно останавливается на способе приготовления геля, приготовлении смеси солей, стерилизации, предварительной подготовке культуры. Освещается смысл каждой мелкой детали приема. В этих первых работах виден уже замечательный экспериментатор, тонкий наблюдатель, глубоко проникающий в сущность явлений.

Применение кремнекислого геля для выделения Nitrosomonas дало вполне благоприятные результаты. В процессе работы этот способ был усовершенствован, что значительно облегчало выделение микроорганизма. Что касается выделения Nitrosomonas на пластинках очищенного агар-агара по методу Бейеринка, то он оказался малопригодным, так как микроорганизм очень медленно развивался в этих условиях.

Таким образом, выделение чистой культуры Nitrosomonas по методу Виноградского в руках такого блестящего экспериментатора, как В. Л. Омелянский, оказалось вполне возможным. Однако большинству других исследователей это не удавалось.

Технические затруднения, связанные с применением этого метода, заставляли искать иных путей. В том же 1899 году появилось новое исследование Василия Леонидовича, посвященное методике выделения нитрифицирующих бактерий. В этой работе предлагается новый метод для изолирования нитрифицирующих бактерий — выращивание их на магнезиально-гипсовых блоках. Однако лишь единичным исследователям удавалось выделить нитрифицирующих бактерий и на этом субстрате (Макринов, 1910).

Несколько позднее описывается метод культивирования нитрифицирующих бактерий на кружках фильтровальной бумаги, увлажненных соответствующей средой.

Наряду с разработкой методов выделения нитрифицирующих бактерий Василий Леонидович изучает их физиологические и морфологические свойства. Его интересуют вопросы, способен ли нитробактер окислять сернистую и фосфористые кислоты, выделяют ли нитратные микробы оксидазу, отношение нитрифицирующих бактерий к окраске.

Химик по образованию, Василий Леонидович уже в этих первых работах проявляет себя искусным мастером в тонких микробиологических методах окраски.

Наконец, следует упомянуть его замечательные статьи общего характера, касающиеся нитрификации, помещенные в энциклопедическом словаре «Handwörterbuch der Naturwissenschaften».

Почти одновременно с изучением нитрификации, т. е. с 1894 г., В. Л. Омелянский начинает исследование о брожении целлюлозы.

Положение этого вопроса в литературе до появления его работ Васи-

лий Леонидович кратко обрисовывает в своей статье 1899 г. («Архив биологических наук»).

Из приведенного обзора видно, что в литературе того времени существовали неправильные представления о возбудителях брожения клетчатки и о химизме этого процесса.

Заканчивая обзор, Василий Леонидович пишет: «Приходилось начинать с самого начала».

Василий Леонидович предполагал первоначально заняться метановым брожением клетчатки, многие стороны которого оставались невыясненными. Прежде всего возникал вопрос о возбудителе — вопрос, оставшийся совершенно незатронутым предыдущими исследованиями. В основу работы был положен метод элективной культуры Виноградского.

Среда состояла из раствора минеральных солей и клетчатки в виде шведской фильтровальной бумаги. Заражение производилось илом, взятым на берегу Малой Невки близ института. Предполагалось, что «отбирающая способность» этих условий окажется достаточной для того, чтобы после длинного ряда последовательных пересевов в культурах остался лишь специфический микроорганизм, вызывающий целлюлозное брожение.

Остальные организмы или отомрут, или будут встречаться в очень ограниченном количестве.

«И в самом деле,— пишет Василий Леонидович,— исследуя под микроскопом препараты, приготовленные из пятой или шестой генерации пересевов,— мы тотчас же были поражены замечательным однообразием картины... Эта картина была настолько характерна, что не могло быть никакого сомнения в том, что перед нами — специфический агент целлюлозного брожения». И Василий Леонидович описывает морфологические признаки найденного микроорганизма, которого он предполагает назвать Bacillus fermentationis cellulosae.

«Из этого краткого описания видно, что микроб, вызывавший в наших культурах брожение клетчатки, не имеет почти ничего общего с Bac. amylobacter, который до сих пор фигурировал во всех руководствах в качестве целлюлозного фермента»,— пишет Василий Леонидович.

Пробы газа из третьего — четвертого последовательных пересевов содержали смесь углекислоты, метана и водорода, причем метан значительно преобладал над водородом.

Согласно предыдущим исследованиям, только метан и углекислота являлись продуктами брожения клетчатки. Присутствие же водорода следовало бы объяснить существованием побочных брожений.

Однако дальнейшие многочисленные анализы газов показали, что исчезает метан, а не водород и, таким образом, возник вопрос о водородном брожении целлюлозы. Из этой первой серии опытов в строго одинаковых условиях с неочищенными культурами Василий Леонидович делает ряд важных выводов.

1) Брожение целлюлозы может происходить в чисто минеральной среде в присутствии только клетчатки.

2) С увеличением числа пересевов брожение не ослабевает. Из смеси микробов удерживается почти только один специфический бацилл, вызывающий брожение.

3) Брожение сопровождается выделением водорода и углекислоты, примесь же метана наблюдается только в первых пересевах.

4) Выделение метана не зависит от условий культивирования, а связано с деятельностью какого-то микроба, исчезнувшего при дальнейших пересевах.

Эти первые результаты давали надежду на то, что выделение микроорганизма в чистом виде не представит непреодолимых затруднений.

«Но уже первые наблюдения ясно указывали на то, что впереди нас

ожидали большие трудности»; «...целлюлозный бацилл решительно отказывался расти на всех нами испробованных субстратах».

Василий Леонидович снова возвращается к культивированию на жидких средах. Но ни метод фракционированного нагревания, ни метод разбавления не привели к положительным результатам. «Отрицательный результат всех вышеописанных опытов очищения культуры побуждал вновь обратиться к обычному приему изолирования — культуре на твердых средах».

Прежде всего проводились опыты на целлюлозе «как на естественном субстрате для данного вида», но и эти попытки окончились неудачей. Причина отсутствия роста микроба на целлюлозных пластинках оставалась для автора загадочной.

Испытывался также ряд сред растительного происхождения: картофель, морковь, брюква, свекла и капуста. Но и на этих средах нельзя было обнаружить колоний целлюлозного микроба. Наконец, после длинного ряда неудач, на некоторых пластинках появились колонии, имевшие вид чрезвычайно мелких желтых капелек, довольно жидких и полупрозрачных... «Микроскопическое исследование препаратов не оставляло никакого сомнения в том, что эти колонии принадлежали целлюлозному бациллу, но картофель оказался также малоподходящей средой для микроорганизма. Иногда тщательные посевы, сделанные с соблюдением полнейшего анаэробиоза, предохраненные от высыхания, все же не удавались. Даже при обильном посеве вырастали только единичные колонии, что указывало на то, что лишь немногие клетки, особенно стойкие, способны развиваться на этом субстрате».

На вырождение микроорганизма указывали и препараты из колоний. Выяснилось также, что на твердой среде микроорганизм терял способность к спорообразованию. Пересевы из колоний в жидкую среду лишь в редких случаях приводили к положительным результатам, да и в этом случае брожение шло вяло и вскоре останавливалось, а дальнейшие пересевы не удавались совсем.

«Тем не менее, как морфологический характер бацилл, составляющих эти колонии на картофеле, так и факт брожения бумаги, не оставлял никакого сомнения в том, что нам удалось получить чистые колонии целлюлозного бацилла».

Слабое брожение клетчатки при заражении чистыми культурами и постоянное присутствие определенного организма (бацилла с овальной спорой) в накопительных культурах наводили на мысль, «что брожение клетчатки, может быть, является результатом ассоциированного действия этих двух организмов». Тщательные исследования показали, что бацилл с овальной спорой брожения клетчатки не вызывает. Брожение остается слабым и при заражении смесью этих двух микроорганизмов.

Решение вопроса не вполне удовлетворяло автора, и он сетует на то, что «попрежнему весьма трудно было располагать чистым посевным материалом или поставить чистый опыт брожения».

Это помешало выяснить вопрос «большого физиологического значения»: как относится к растворимым углеводам бацилла, разлагающая клетчатку?

Испытание показало, что микроорганизм не развивался на углеводах. Одинаковые результаты дали опыты, в которых азот прибавлялся в виде $(NH_4)_2SO_4$ или в виде пептона. Это позволяет автору высказать предположение, что выделенный бацилл «есть пример микроба со строго специализированной функцией». Однако Василий Леонидович не настаивает на нем, так как это заключение легко может вызвать возражение, что причиной отсутствия роста является трудность культивирования микроорганизма.

Бактериологическую часть исследования В. Л. Омелянский заканчивает описанием способа выделения целлюлозного микроорганизма

из почвы. Но здесь же выражает сожаление, что «далеко не всегда удается этим путем напасть на водородное брожение целлюлозы, ...нередко, как оказалось в позднейших опытах, в тех же условиях развивается метановое брожение. Причина возникновения того или другого брожения до сих пор остается невыясненной, как не выяснено еще и много других вопросов в этой области, так трудно поддающейся изучению».

Далее Василий Леонидович переходит к физиологическим исследованиям и с первых же слов предупреждает, что приводимые данные относятся к нечистым культурам, однако настолько обогащенным специфическим микроорганизмом, что «без сомнения, могут служить для характеристики типичного водородного брожения целлюлозы».

На основании многочисленных химических анализов, образцовых по тщательности и точности выполнения, В. Л. Омелянский приходит к заключению, что «водородное брожение целлюлозы представляет совершенно самостоятельный микробный процесс, определяемый жизнедеятельностью специфического микроба».

Василий Леонидович установил, что брожение целлюлозы сопровождается образованием жирных кислот (70%) уксусной и масляной и только 30% составляют газообразные продукты — водород и углекислота.

Не меньшей полнотой отличаются исследования Василия Леонидовича о метановом брожении целлюлозы, изложенные в ряде статей за 1902 и 1903 гг.

Первая часть исследования посвящена условиям, в которых развивается метановое брожение целлюлозы и приводятся многочисленные данные химических анализов, характеризующих состав газа. В результате серии опытов Василий Леонидович устанавливает, что, применяя пастеризацию, можно направить процесс или в сторону метанового брожения клетчатки, или в сторону водородного. Пастеризация на известном этапе развития смешанной культуры становится методом разделения этих двух видов микроорганизмов.

Морфологически оба микроорганизма сходны, но возбудитель метанового брожения клетчатки несколько тоньше.

Пользуясь микроскопически чистой культурой, Василий Леонидович показал, что метановое брожение клетчатки также сопровождается образованием жирных кислот.

С. Н. Виноградский, вспоминая об этих опытах Василия Леонидовича, писал:

«Много усилия отдал Василий Леонидович этой своей первой работе. Над открытыми им бациллами, метановым и водородным брожениями, он изощрился в микроскопировании, снимая их овладел микрофотографией, к ним применил свою основательную химическую подготовку. Успехи по характеру объекта доставались медленно, с трудом. Усталости и разочарования, однако, ни разу не пришлось наблюдать; такая реакция была ему как бы не свойственна или, по крайней мере, на нем не отражалась. Зато как сиял он, когда опыты удавались! Помню его радость, когда он показывал мне истонченное бациллами кружево бумажки, фотографии которых потом воспроизводили в своих „Основах микробиологии“. В результате 3—4-летних трудов начинающего ученого создалась работа, признанная образцовой по методу исследования и по полноте данных».

Василий Леонидович всегда стремился найти практическое применение научным достижениям и уже в 1904 г., т. е. непосредственно вслед за появлением работ по разложению клетчатки, публикует исследование о гистологических и химических изменениях льняного волокна под влиянием возбудителей пектинового брожения и возбудителей водородного брожения. В этих работах он показал, что пектиновое брожение не разрушает волокна, а вызывает только распад его на волоконца.

Эти данные подвели научную основу под технологический процесс мочки льна и содействовали правильной постановке его.

Прошло более шестидесяти лет со времени опубликования работ В. Л. Омелянского о водородном и метановом брожении целлюлозы. Многое изменилось в науке, но брожение целлюлозы с выделением H_2 остается незыблемым фактом и подтверждено теперь в опытах на чистых культурах.

Большое место в научной деятельности Василия Леонидовича занимают исследования микроорганизмов, фиксирующих азот.

В этих исследованиях так ярко сказывается присущая В. Л. Омелянскому способность охватывать вопрос со всех сторон. Его работы посвящены распространению функции связывания свободного азота в растительном царстве, морфологии и цитологии азотфиксирующих бактерий, их биологии, физиологии и распространению. Он выясняет также условия, обеспечивающие наиболее продуктивную работу азотфиксаторов, и разрабатывает вопрос об их применении для удобрения полей.

Завершением всех этих работ явилась монография «Связывание атмосферного азота почвенными микробами» (1923).

«Присуща ли функция связывания атмосферного азота только немногим группам бактерий, или же она широко распространена в растительном мире на всех этапах его развития»,— ставит вопрос Василий Леонидович на первой странице своей монографии.

Исходя из той точки зрения, что физиологические свойства, так же как и морфологические, вырабатываются постепенно, Василий Леонидович допускает априорно, что функция связывания азота присуща в большей или меньшей степени не только микроорганизмам, но и «другим классам растительных существ».

Как указывает В. Л. Омелянский, по исследованиям Виноградского, функция связывания азота составляет специфическую особенность лишь немногих видов микроорганизмов, но тут же оговаривается, что выводы Виноградского непосредственно вытекают из его исследований «и не претендуют на значение общих положений», как это говорит и сам Виноградский.

Цитологические и морфологические исследования азотфиксирующих бактерий рисуют картину изменений формы и внутреннего содержимого клеток в зависимости от состава среды.

Блестяще владея микроскопической техникой, В. Л. Омелянский проникает в тонкие детали этих изменений и со свойственным ему мастерством превосходно отображает их на фото и рисунках.

В исследованиях, посвященных физиологии и биологии азотфиксирующих бактерий, Василий Леонидович разрешает ряд важных вопросов, касающихся методов выделения азотфиксирующих бактерий, роста их на жидких и плотных средах, отношения к температуре и пр. Главное же внимание уделяется фиксации атмосферного азота — выясняется влияние минеральных солей на этот процесс, аэрации, реакции среды, влияние различных вытяжек.

Исследуется также, какое влияние на процесс оказывает возраст культуры, взятой для посева, предварительное культивирование и пр.

Было также показано, что количество усвояемого азота пропорционально усвоению органического вещества.

* * *

Обладая обширными знаниями в различных областях микробиологии, В. Л. Омелянский проводит исследования по весьма разнообразным вопросам.

Ряд работ посвящен брожению пектиновых веществ, образованию водорода при разложении муравьинокислых солей и разложению этило-

вого спирта в анаэробных условиях. Последняя работа послужила основанием для развития новой главы общей микробиологии — образование метана при разложении различных органических веществ под влиянием специфических возбудителей.

Василием Леонидовичем Омелянским выделены и описаны микроорганизмы, образующие в культурах фруктовый аромат, и опубликован ряд других работ.

В последние годы жизни В. Л. Омелянский интересовался геологической деятельностью микроорганизмов. В 1927 г. появилась его последняя экспериментальная работа, озаглавленная «Роль микроорганизмов в выветривании горных пород».

* * *

Тонкий экспериментатор, В. Л. Омелянский уделял большое внимание разработке методов исследования. Из работ в этой области заслуженной известностью пользовался способ окраски нитрифицирующих бактерий и специальные среды для дифференциальной диагностики некоторых патогенных микробов.

Долгое время широко применялся прибор Омелянского для культивирования анаэробов. Он изображен во всех изданиях «Основ микробиологии» и хорошо известен всем.

О методах культивирования нитрифицирующих бактерий и разлагающих клетчатку упомянуто было уже ранее.

* * *

В научной деятельности Василия Леонидовича есть один вид работы, который хотя и не занимал в ней большого места, но оставил глубокий след,— это статьи общего характера, приуроченные большею частью к юбилейным датам, или статьи, изданные в виде отдельных брошюр; таковы, например, блестящие речи: «Пути развития микробиологии в России», речь, произнесенная на открытии 8-го съезда бактериологов, эпидемиологов и санитарных врачей 20 мая 1924 г.; «О биохимическом направлении в бактериологии», речь, произнесенная на собрании по случаю юбилея И. П. Павлова 6 ноября 1924 г.; «Очередные задачи современной микробиологии», речь на торжественном годовом собрании Академии наук 2 февраля 1925 г. Хорошо известны брошюры: «Микроорганизмы, как химические реактивы», «Научное творчество и случайные открытия» и ряд других статей.

В Большой Советской энциклопедии В. Л. Омелянским написан ряд статей — «Бактерии», «Брожение» и др.

Обширная и разносторонняя эрудиция позволила В. Л. Омелянскому посвятить ряд статей истории развития идей в области теоретической микробиологии и делать широкие обобщения по тем или иным проблемам.

Эти статьи, написанные необыкновенно живо, читаются с интересом. В них высказано много оригинальных мыслей, имеющих значение и по сей день.

В расцвете своей научной деятельности В. Л. Омелянский приступает к изданию «Основ микробиологии» (около 1909 г.).

Один из сотрудников лаборатории Василия Леонидовича — И. А. Макринов так описывает создание этой классической книги:

«Для составления этой книги была проделана очень большая работа: по каждой главе, по каждому вопросу собирался обширный материал — литературный, собственный экспериментальный, фотографии, всевозможные записи и пр.; весь этот материал тщательно изучался, сортировался: из него выбиралось только самое важное, главное, все несущественное

отбрасывалось; но и материал, признанный нужным, необходимым, излагался необычайно кратко; зачастую эта скупость изложения дополнялась прекрасными рисунками, и, в результате, по каждому вопросу, по каждому описываемому явлению получалось из его книги ясное представление. Часто в его книге буквально одной строчкой, двумятремя предложениями описывалось целое течение в данной области».

Первое издание «Основ микробиологии» (1909) разошлось необычайно быстро и в 1913 г. вышло уже второе. Книга удовлетворяла самым строгим требованиям. Сказывалась огромная нужда в такого рода издании. «Основы микробиологии» выдержали десять изданий (три последних — посмертные).

В предисловии к первому изданию В. Л. Омелянский пишет: «Выпускаемая книга представляет собою в обработанном виде курс лекций, читанных мною в 1906—1909 гг. на Высших Женских Естественно-научных курсах. Подготовляя эти лекции к печати, я имел в виду не только дать руководство для своих слушательниц, но и восполнить весьма существенный пробел в русской научной литературе — отсутствие сколько-нибудь подходящего сочинения по общей бактериологии, могущего служить для первоначального ознакомления с нею и основой для дальнейших занятий в этой области».

Но книга имела, несомненно, неизмеримо большее значение, чем предполагал автор.

Три первые главы ее введения — предмет микробиологии и ее задачи, исторический очерк, первичное зарождение — являются богатейшим вкладом не только в область теоретической микробиологии, но и в биологию вообще.

«Основы микробиологии» воспитали не одно поколение русских микробиологов.

Все исследования В. Л. Омелянского проникнуты идеей специфичности микроорганизмов. Эта идея прекрасно иллюстрируется богатым материалом в его книге «Микроорганизмы, как химические реагенты» и в ряде других статей.

Отсюда и подход к изучению микроорганизмов — культивирование в строго специфических условиях, применение элективных сред.

С. П. Костычев пишет:

«Во всех работах В. Л. Омелянского подход к теме — чисто химический. Совершенно правильно он рассматривал микробов как своеобразные химические реактивы и считал микробиологию особым отделом химии».

Глубокое понимание биологии микроорганизмов позволяет ему видеть и другие стороны их жизни — их изменчивость, их приспособляемость, высокую чувствительность к различным реагентам.

Теоретические представления В. Л. в области микробиологии базируются на эволюционной теории Дарвина и на материалистическом понимании природы.

В предисловии к первому изданию «Основ микробиологии» В. Л. Омелянский пишет:

«...Легкая приспособляемость бактерий к условиям существования, в связи с быстрой сменой генераций у них и передачей приобретенных свойств из поколения в поколение, делает бактерий наиболее удобным объектом для решения вопроса о происхождении разновидностей, как морфологических, так и физиологических».

Василий Леонидович развивал прогрессивные взгляды на происхождение жизни на земле. Он писал:

«...Возможно, и даже вероятно, что первыми представителями организованного мира являлись не эти простейшие из теперь известных существ, не бактерии, не амебы, а какие-то другие, более примитивные организмы, покуда нам неизвестные. Идея дальнейшего расчленения

простейшего элемента жизни — клетки — так же законна, как и идея расчленения простейшего элемента материи — атома — на электроны — носители электрической энергии...» «Таковы априорные соображения, заставляющие нас признать вероятность гипотезы о самопроизвольном зарождении».

* * *

Блестящие открытия С. Н. Виноградского и В. Л. Омелянского послужили толчком к развитию отечественной микробиологии. Учреждались кафедры микробиологии (в университетских городах), возникла потребность в издании практического руководства по микробиологии.

Василий Леонидович всегда любил сам своими руками делать повседневную микробиологическую работу и делал это очень искусно. В 1911 г. ему был присужден почетный диплом за экспонаты на Международную гигиеническую выставку в Дрездене, а в 1913 г. он получил также почетный диплом за экспонаты культур бактерий на Всероссийской гигиенической выставке в Петербурге.

В двадцатых годах текущего столетия В. Л. Омелянский приступает к изданию практического руководства по микробиологии.

Василий Леонидович рассказывал, что эта книга написана им по просьбе его учеников. Отсутствие руководства часто заставляло их прибегать к личным методическим записям Василия Леонидовича или обращаться к нему за разъяснениями, чем отрывали его от работы. Сознавая, что это очень затрудняет В. Л. Омелянского, они просили его опубликовать свое методическое руководство.

В. Л. Омелянский с большой охотой взялся за этот труд и посвятил книгу «Молодым русским микробиологам». В эту книгу В. Л. Омелянский вложил весь свой большой опыт ученого, внесшего так много в различные области микробиологии.

Это настольная книга каждого из нас, микробиологов.

Вряд ли нужно говорить, насколько она облегчила изучение микробиологии. С чувством глубокой признательности это скажет каждый микробиолог. Потребность в руководстве такого рода была настолько велика, что первое издание, вышедшее в 1923 г., разошлось в течение двух лет.

В последующие годы Василий Леонидович подготовлял материал для второго издания, предполагал выпустить книгу в значительно большем объеме. Но смерть прервала начатый труд.

По общему признанию, В. Л. Омелянский был талантливым популяризатором. Он оставил немало научно-популярных книг и статей, напечатанных в различных журналах.

«Есть в науке вопросы,— писал Василий Леонидович,— привлекающие к себе внимание не только ученых специалистов, но и широкого круга образованных людей. Это те вопросы, которые так или иначе соприкасаются со жгучими социальными проблемами современности, либо близко касаются животрепещущей темы о сохранении здоровья и жизни человека. Естественно, что вопросами этого последнего рода особенно интересуются широкие массы населения».

Популярные статьи В. Л. Омелянского много содействовали ознакомлению масс с достижениями науки. В живом, красочном и увлекательном изложении знакомит В. Л. Омелянский с достижениями науки, рисующими роль бактерий как химических реагентов, с микробами, связывающими атмосферный азот, и пр.

В. Л. Омелянский всегда охотно отзывался на запросы практики. Его перу принадлежит ряд статей по хлебопечению, по молочнокислому брожению. Развитие цынги в годы первой мировой войны побудило военное ведомство организовать получение лимонной кислоты в заводском

масштабе, для использования ее как противоцынготного средства. В связи с этим В. Л. Омелянский проводит ряд разведочных лабораторных опытов по получению лимонной кислоты из сахара под воздействием Cytromyces и составляет критический обзор литературы по этому вопросу.

В годы гражданской войны, когда остро ощущался недостаток некоторых пищевых продуктов, В. Л. Омелянский разрабатывает ряд вопросов по хлебопечению и молочнокислому брожению.

Не могу не упомянуть еще о двух прекрасных работах В. Л. Омелянского — биографии Ильи Ильича Мечникова и биографии Луи Пастера. Эти произведения являются образцом литературного творчества такого рода. Образы Мечникова и Пастера встают как живые со страниц его книг.

* * *

Нам остается коснуться еще одной стороны деятельности Василия Леонидовича — его редакционной работы.

С 1906 г. до конца жизни В. Л. был редактором «Архива Биологических наук». В связи с этим он вел обширную переписку со многими выдающимися учеными русскими и иностранными. К сожалению, сохранилось лишь очень немного из этой переписки.

Василий Леонидович Омелянский умер в Гаграх 21 апреля 1928 г., т. е. на 62-м году жизни, от кровоизлияния в мозг.

Последние годы его здоровье внушало серьезные опасения, но все же смерть пришла неожиданно. От него приходили обнадеживающие письма, что он чувствует себя лучше и значительно окреп. Известие о его смерти глубоко поразило всех.

Правительство распорядилось перевезти его тело в свинцовом гробу в Ленинград.

На траурном заседании, посвященном памяти В. Л. Омелянского, организованном Институтом экспериментальной медицины и Академией наук 20 V 1928 г., С. С. Салазкин так закончил свою речь: «...вся научная жизнь Василия Леонидовича, да, пожалуй, вообще вся его жизнь прошла в Институте экспериментальной медицины... Смерть лишила Институт не только выдающегося ученого, не только деятельного участника всей жизни института, но и незаменимого, редкого по своим качествам, по своей душевной красоте человека».

В. Л. Омелянский горячо любил свою Родину. Эта любовь сказывается в его творениях, часто непосредственно отвечающих запросам и нуждам нашего государства.

В. И. Ленин, интересовавшийся возможностью применения микробов для повышения плодородия почвы, сносился через своего секретаря по данному вопросу с Василием Леонидовичем, о чем указывает Б. Л. Исаченко.

К В. Л. Омелянскому вполне приложимы слова, сказанные им о И. И. Мечникове... «его научные идеи еще долго останутся руководящими в дальнейшем развитии положительных знаний». Русская наука обязана многим В. Л. Омелянскому, и его преждевременная смерть явилась тяжелой утратой.

«Я желал бы только отметить,— говорит С. Н. Виноградский,— крупную его роль в насаждении микробиологических знаний в России (совершенно отрицая ту часть этой роли, которая иногда приписывается мне). Моя деятельность в России была слишком мало продолжительной, чтобы создать, как принято выражаться, научную школу и протекала она в такую пору, когда разрабатываемые мною вопросы не привлекали особого интереса, если судить по тому, что у меня не было учеников и сотрудников кроме Омелянского. Учеников и сотрудников привлек он,

когда я был уже далеко и с этим совпало развитие его крупных педагогических дарований, венцом которых явились „Основы микробиологии", первый русский учебник этой области)».

Образ Василия Леонидовича в немногих словах с такой полнотой очерчен С. Н. Виноградским, что дополнять его нет надобности. В изображении Виноградского — перед нами живой, обаятельный Василий Леонидович. Таким, как описывает его Виноградский в 1893 г., он остался до конца своих дней.

Работы В. Л. Омелянского вошли в сокровищницу нашей науки и доставили ему мировую известность. Уже в 1909 г. В. Л. Омелянский избирается членом-корреспондентом Туринской медицинской академии, в 1916 г.— членом-корреспондентом нашей Академии наук, но лишь при советской власти труды В. Л. Омелянского получили достойную оценку и в 1923 г., по представлению акад. И. П. Павлова и других, он избирается действительным членом Академии наук.

Последние годы жизни Василия Леонидовича ознаменовались избранием его почетным членом многих научных обществ.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Получено 16.II.1953 г.

ЛИТЕРАТУРА

Виноградский С. Н. Памяти В. Л. Омелянского (Личные воспоминания). Архив биол. наук, т. XXVIII, вып. 3, стр. 201, 1928.

Заболотный Д. К. Тридцать пять лет служения микробиологии (Памяти акад. В. Л. Омелянского). Там же, стр. 207.

Исаченко Б. Л. Отдел общей микробиологии. Материалы к истории Всесоюзного института экспериментальной медицины, т. 1, стр. 87. Наркомздрав СССР, Медгиз, 1941.

Исаченко Б. Л. Василий Леонидович Омелянский. «Люди русской науки». Гос. изд-во техн.-теорет. литературы, т. II, 1948.

Красавицкий П. М. В. Л. Омелянский. Материалы к истории Всесоюзного института экспериментальной медицины, т. 1, стр. 176, Наркомздрав СССР, Медгиз, 1941.

Макринов И. А. Василий Леонидович Омелянский. Архив биол. наук, т. XXVIII, вып. 3, стр. 210, 1928.

Материалы из Архива Академии наук СССР.

ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР NITROSOMONAS

А. А. Имшенецкий и *Е. Л. Рубан*

Открытие хемосинтеза С. Н. Виноградским [1] в конце прошлого столетия — одно из наиболее выдающихся достижений нашей отечественной микробиологии. Автор этого учения имел возможность на протяжении десятилетий следить за его развитием, и хотя это учение было дополнено данными о существовании ряда миксотрофных организмов, оно выдержало испытание временем и основные его положения продолжают оставаться бесспорными и в настоящее время.

Среди автотрофов особенное внимание привлекали нитрифицирующие бактерии. Это — классические хемосинтетики, так как именно с этими бактериями были проведены наиболее убедительные эксперименты, в которых было установлено соотношение между количеством окисленного аммиака и ассимилированной углекислоты.

В последние годы благодаря развитию экологии микроорганизмов иногда указывается на несовершенство метода чистых культур и подчеркивается, что условия существования микроорганизмов в чистых культурах далеки от условий, в которых они находятся в природе. Эти указания совершенно справедливы. Однако это не значит, что изучение чистых культур не сохраняет всего своего значения. Метод чистых культур входит в качестве необходимого элемента в изучение экологии микроорганизмов, так как последующий синтез не может быть произведен без этого анализа. Нет надобности подчеркивать, что только при помощи чистых культур можно составить действительное представление об истории развития, систематическом положении и физиологических особенностях микроорганизма.

В микробиологической литературе можно найти много примеров, когда экстравагантные выводы делались только на основании изучения смешанных культур.

Существуют микроорганизмы, получение чистых культур которых сопряжено с известными трудностями. Это касается анаэробных целлюлозных бактерий, сине-зеленых водорослей, десульфирующих бактерий, серобактерий, миксобактерий, разлагающих клетчатку, и некоторых других микробов. В этом списке одно из первых мест должны занимать нитрифицирующие бактерии. Достаточно вспомнить, что за 60 лет изучения нитрификации имеются единичные работы, проведенные с чистыми культурами. Музеи, созданные при микробиологических институтах, как правило, таких культур не имеют. Между тем решение ряда вопросов, связанных с физиологией, биохимическими особенностями и систематическим положением нитрификаторов, возможно только в том случае, если исследователь будет иметь чистые культуры.

В связи с этим нами было предпринято сравнительное изучение различных методов выделения чистых культур нитрифицирующих бактерий, окисляющих аммиак, т. е. Nitrosomonas. Основная задача работы — предложить методы, дающие воспроизводимые результаты и позволяющие систематически выделять чистые культуры. Мы не будем останавливаться на методах, не давших нам положительных результатов, а приведем описание только тех способов, которые позволили выделить чистые культуры. В этом сообщении мы ограничимся изложением результатов иссле-

дований, связанных с выделением культур, что же касается их физиологических особенностей, то это составит содержание следующих сообщений.

Методика

Культивирование накопительных и чистых культур Nitrosomonas производилось на жидкой среде Виноградского следующего состава: дестиллированной воды — 1000 мл, $(NH_4)_2SO_4$ — 2 г, K_2HPO_4 — 1 г, $MgSO_4$ — 0,5 г, NaCl — 2 г, $FeSO_4$ — 0,4 г в каждую колбу добавлялось по 0,5 г мела.

Параллельно культуры выращивались также на среде, предложенной Майкладжон (Meikeljohn [7]. Ее состав следующий: NaCl — 0,3 г. $MgSO_4$ — 0,14 г, $FeSO_4$ — 0,03 г, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,66 г, KH_2PO_4 — 0,1 г и 1 мл смеси следов микроэлементов ($LiSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, H_3PO_4, $Al_2(SO_4)_3$, $SnCl_2$, $MnCl_2$, $NiCl_2$, $CoSO_4$, $TiCl_4$, KI, KBr) в 1 л дестиллированной воды.

Жидкие питательные среды наливались в колбы, емкостью в 50 мл, слоем, высота которого равнялась 3—5 мм. Посевы производились также в большие колбы, содержащие 50 мл среды. Помимо жидких сред, выращивание нитрификаторов производилось на пластинках кремнекислого геля с мелом, пропитанных средой Виноградского. При помощи пробы Тромсдорфа определялась интенсивность процесса нитрификации. Различная степень окраски позволяла судить об энергии нитрификации.

Получение накопительных культур

Для получения накопительных культур образцы различных почв в количестве 0,5—1,0 г вносились в колбы, содержащие 50 мл среды Виноградского. Колбы выдерживались при 28°. Обычно через 3—4 суток в культуральной жидкости обнаруживалось значительное количество нитритов. Такие накопительные культуры пассировались, но пересевы производились в колбы уже меньшего размера. С целью обогатить культуру клетками Nitrosomonas делались пассажи очень молодых культур 2—4-дневных. Это приводило к уменьшению числа сопутствующих бактерий. Сами пересевы осуществлялись путем переноса только одной петли осадка, взятого со дна колбы. Через четыре-пять пассажей жидкие накопительные культуры служили материалом для выделения чистых культур.

Накопительные культуры получались также путем посева комочков почвы на чашки с кремнекислым гелем, пропитанных средой Виноградского и покрытых «эмалью» из мела. Такие посевы выдерживались при комнатной температуре; с целью избежать высыхания пластинок кремнекислого геля чашки помещались в эксикаторы, на дно которых была налита вода. Через 12—20 дней появились зоны растворения мела. Как было отмечено ранее одним из авторов (Имшенецкий [2]), клетки Nitrosomonas могут быть обнаружены не только в старых участках зоны, т. е. там, где растворен мел, но и в окружающих эту зону участках белой «эмали». Именно из этих периферических участков, где полностью еще отсутствует растворение мела, целесообразно брать материал для заражения жидких сред или для пересева культуры на стерильные пластинки кремнекислого геля. В этом посевном материале меньше посторонних бактерий; последние в большом количестве содержатся в «старых» участках зон растворения, так как в них больше клеток и, следовательно, больше органического вещества, доступного для гетеротрофных бактерий-спутников.

Выделение чистых культур

Метод глубинных колоний

В последние годы благодаря усовершенствованию микробиологических методик все чаще и чаще чистые культуры микроорганизмов, трудно освобождаемые от посторонних бактерий, получают путем отсева из изолированных колоний. Это касается анаэробных бактерий, вызывающих раневые инфекции, мезофильных и термофильных бактерий, сбраживающих целлюлозу, ряда миксобактерий и др. На поверхности колоний Nitrosomonas, появляющихся на поверхности кремнекислого геля, покрытого «белой эмалью», всегда присутствуют бактерии-спутники. Очистить культуру Nitrosomonas путем пересевов на пластинки из кремнекислого геля материала, взятого из колоний, невозможно. Повидимому, конденсационная вода и чрезмерная влажность поверхности гелевой пластинки, которую трудно избежать, делают этот метод нереальным. Совершенно иные условия создаются в том случае, когда Nitrosomonas развивается в толще застывшего кремнекислого геля. В этом случае достигается пространственная изоляция клеток нитрификаторов, а посторонние бактерии не могут проникнуть и загрязнить глубинные колонии, развивающиеся в геле. Аэрация в этих условиях остается достаточной и Nitrosomonas развивается хорошо.

Этот метод выделения состоял в том, что 1 мл накопительной культуры Nitrosomonas вносился в 10 мл 0,75%-ного стерильного раствора NaCl и через жидкость в течение 20 минут пропускался ток углекислоты, промытой стерильной дестиллированной водой. Этим достигалось растворение мела благодаря его переходу в бикарбонат кальция и освобождение клеток Nitrosomonas, приставших к твердым частицам.

После осветления 1 мл взвеси микроорганизмов в 0,75% NaCl вносился в стерильную чашку Петри, содержащую 1 мл стерильной среды следующего состава: $NaCl$ — 2%, $MgSO_4$ — 0,5%, Na_2HPO_4 — 12%, KH_2PO_4 — 4%, $FeSO_4$ — 0,01%, $MnSO_4$ — 0,01%, $NaHCO_3$ — 1% и 1 мл 5%-ного раствора $(NH_4)_2SO_4$, и все это смешивалось с 10 мл стерильного раствора кремневой кислоты. Через несколько минут смесь затвердевала. Раствор кремневой кислоты готовился из смеси кремнекислого натрия удельного веса 1,10 и соляной кислоты удельного веса 1,09 и очищался от хлора диализом. Для этого смесь кремнекислого натрия с соляной кислотой тотчас после приготовления помещалась в коллодийный или в целлофановый мешок и диализировалась в течение 1—$1^1/_2$ суток в дестиллированной воде, сменяемой за это время 6—8 раз. Следует отметить, что лучше диализировать небольшие порции кремнекислого геля — 100—200 мм, температура воды в диализаторе не должна превышать 10—12°, в противном случае происходит свертывание геля раньше окончания диализа. После диализа раствор кремневой кислоты выливался в колбы и стерилизовался при 120° в течение 20 минут. В таком виде он сохранялся для работы. Таким образом, все эти исследования были проведены со стерильными пластинками геля.

В чашках с прозрачным плотным гелем через 6 суток выдерживания при 30° можно было видеть микроколонии нитрозных бактерий. Из колоний под контролем глаза (малое увеличение микроскопа) тонкой иглой или волосным капилляром производились пересевы в маленькие колбы с жидкими средами упомянутого выше состава. Всего этим методом из отсеянных 86 колоний было получено две чистые культуры.

Капельный метод

В основу этого метода был положен прием, в течение многих десятилетий с успехом применяющийся для выделения культур плесневых грибов и дрожжей из одной клетки. Принцип этого способа, как известно,

заключается в том, что при незначительном количестве клеток в жидкости можно нанести на покровное стекло такие мелкие капельки жидкости, что некоторые из них будут содержать только одну клетку.

В наших исследованиях для нанесения мелких капелек на стекло применялись не металлические перья или иглы, как обычно, а микропипетка, предложенная для этой цели Комаровой [5]. При помощи микропипетки, имеющей капиллярный просвет и отшлифованный конец, можно наносить на предметное стекло очень маленькие капли. Непосредственно перед выделением через накопительную культуру Nitrosomonas пропускался в течение 20 минут ток углекислоты, промытой дестиллированной водой.

Из такой, ставшей прозрачной в результате растворения мела, накопительной культуры, при помощи микропипетки наносились на предметное стекло капли, имевшие диаметр 0,2—0,3 мм. После нанесения капель они возможно скорее снимались со стекла стерильным кусочком фильтровальной бумаги, имевшим клиновидную форму. Кусочки бумаги были небольшой величины и стерилизовались предварительно в чашках Петри.

Таким образом, применение микропипетки составляет первую особенность метода.

Вторая особенность способа заключалась в том, что нанесение капелек производилось не из взвеси клеток в свежей питательной среде, а из культуральной жидкости. Поэтому клетки Nitrosomonas, пространственно изолированные в капельках, сразу переносились со стекла в стерильную питательную среду в колбы. В отличие от грибов и дрожжей, мы не ожидали размножения этих клеток в каплях.

Третья особенность этого метода заключалась в том, что при его помощи производилось выделение не одноклеточных культур, а чистых культур, свободных от сопутствующих бактерий. Не исключена возможность, что такие культуры вырастали не только из одной, но также из двух-трех и более клеток, находившихся в капельке.

В общей сложности было посеяно 250 капель в 250 колб и в 22 культурах в дальнейшем была обнаружена реакция на нитриты. Однако только в 4 колбах культуры оказались чистыми, тогда как в остальных 18 вместе с нитрифицирующими бактериями развились также посторонние бактерии. В остальных 228 колбах развития микроорганизмов не было и даже через 30 дней реакция на нитриты была отрицательной.

Успех этого метода выделения культур Nitrosomonas зависит от количества клеток, находящихся в культуральной жидкости. Мы видим, что при большом количестве отрицательных результатов есть шансы получить культуры, свободные от бактерий-спутников.

Проверка чистоты культур

Некоторые особенности физиологии чистых культур Nitrosomonas, о которых будет сказано ниже, побудили нас проявить большую педантичность при проверке чистоты культур. Следовало доказать, что в данной культуре не содержатся другие микробы, помимо нитрификаторов. С этой целью производились посевы чистых культур Nitrosomonas на самые различные питательные среды. Учитывая, что сопутствующие микроорганизмы часто находятся в небольшом числе, мы производили посев не петлей, а пипеткой. В каждую среду вносилось 0,5 мл культуры. Такие контрольные посевы были произведены на различные питательные среды: МПА, МПЖ, МПБ, МПБ + 1% глюкозы, МПБ + 1% дрожжевого автолизата, картофельный агар, картофельная крошка, среда Эшби, для азотобактера почвенный агар с 1% глюкозы. Это все среды для обнаружения аэробных и факультативно-анаэробных сопутствующих бактерий. Помимо этого, производился посев культур в рас-

плавленный и остывший мясо-пептонный агар, который затем насасывался в трубки Виньяля, и концы их запаивались. Это было необходимо для обнаружения анаэробных бактерий-спутников. Посевы выдерживались в термостате при 30—37° в течение 10 дней.

В дальнейшем производилось не только визуальное изучение поверхности плотных сред и степени мутности жидких сред, но также микроскопия конденсационной воды в пробирках с плотными средами и микроскопия жидких сред.

Второй метод проверки чистоты заключался в микроскопии препаратов, сделанных из отцентрифугированного осадка культуры. Для этого вся культуральная жидкость из колбы осветлялась путем растворения мела слабой соляной или уксусной кислотой (2—3%), а затем эта жидкость центрифугировалась при 10 тысячах оборотов в минуту. Значительная часть жидкости декантировалась, а небольшое количество оставшейся жидкости и осадок тщательно размешивались и вся жидкость выливалась на предметное стекло. Затем жидкость высушивалась, фиксировалась спиртом и препарат окрашивался лефлеровской метиленовой синью или карболовым эритрозином.

Метод микроскопии имеет большое значение при проверке чистоты культур, так как таким путем можно обнаружить присутствие палочковидных форм, что, конечно, будет говорить о загрязнении культуры. В противоположность этому, однообразная микроскопическая картина, т. е. нахождение в препарате только округлых или слегка удлиненных или делящихся клеток Nitrosomonas, подтверждает чистоту культуры.

Естественно, что при проверке чистоты культуры необходимо применять оба метода и такая проверка должна осуществляться неоднократно и у культур, имеющих различный возраст.

Проведенные высевы чистых культур полностью подтвердили автотрофность Nitrosomonas — он совершенно не давал роста на всех без исключения средах. Таким образом, лишний раз доказывается отсутствие миксотрофных рас.

Характеристика чистых культур

Описанными выше методами было получено 9 чистых культур нитрифицирующих бактерий. В морфологическом отношении все они были однотипны. Это были кокки, удлинявшиеся слегка с возрастом и приобретавшие эллипсовидную форму. Затем они делились пополам, и в препаратах часто встречались парно расположенные кокки. У совершенно разделившихся кокков одна их поверхность долго оставалась уплощенной (рис. 1). Палочковидные клетки в культурах отсутствовали. Таким образом, морфология Nitrosomonas полностью соответствовала описанию, данному С. Н. Виноградским. В изолированных культурах никогда не встречалось клеток, близких по своей морфологии с Nitrosogleae, Nitrocystis и т. д.

Микроколонии Nitrosomonas через шесть-семь суток представляли собой еле видимые невооруженным глазом белые точки; при малом увеличении микроскопа (10 × 8) они вначале имели вид полупрозрачных желтоватых образований, которые уплотнялись и приобретали буроватую окраску. Форма их часто бывала неправильной угловатой, контуры резкие, и по своему внешнему виду они напоминали песчинки (рис. 2). С возрастом (через две-три недели) контуры колоний становились менее резкими и при малом увеличении микроскопа было ясно видно зернистое строение колоний.

Хранение чистых культур в лабораторных условиях оказалось более сложной задачей, чем накопительных культур нитрифицирующих бактерий. За летний период часть чистых культур погибла и при дальнейших

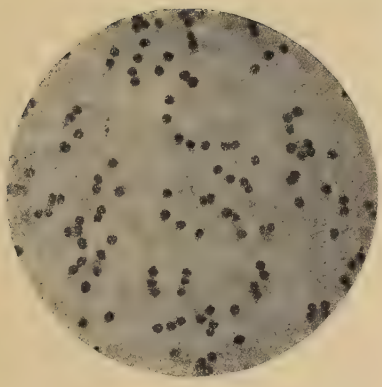


Рис 1. Клетки Nitrosomonas из чистой культуры на жидкой среде Виноградского. Ув. × 2400.

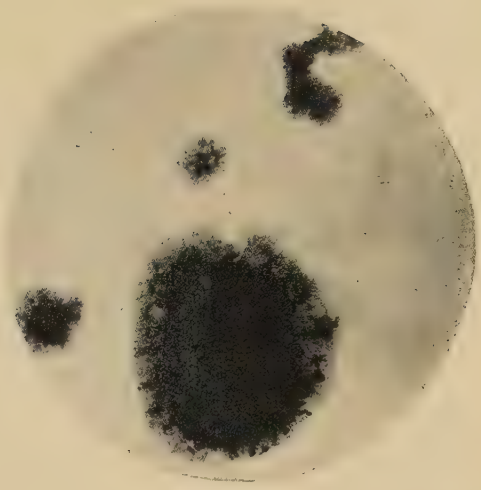
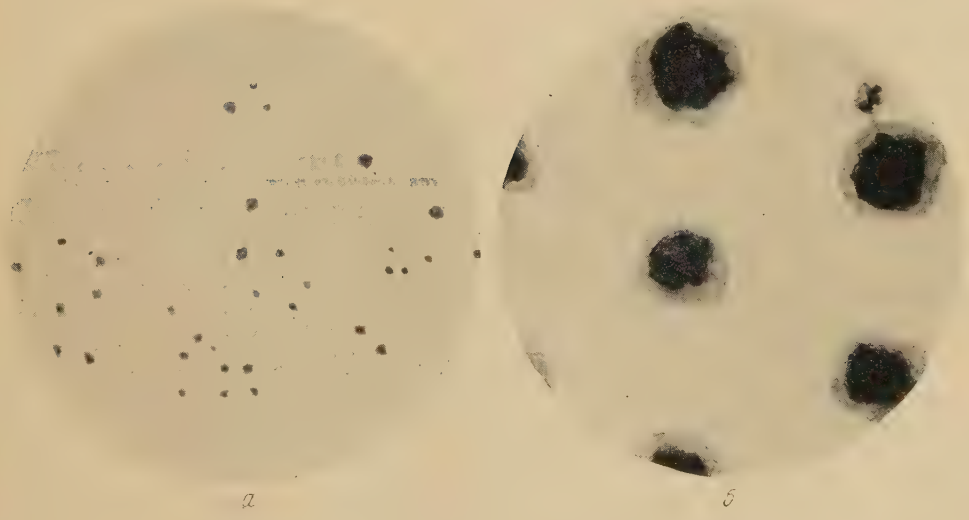


Рис. 4. Участки частичного растворения мела в чистой культуре Nitrosomonas, выросшей в чашке с пластинкой кремнекислого геля. Возраст культуры 20 дней. Ув. ×120



а *б*

Рис. 3. Зоны «просветления». Возраст культур 20 дней. Натуральная величина.

а—чистая культура, *б*—смешанная культура

пересевах не дала роста. Для сохранения чистых культур необходимо производить более многочисленные параллельные пересевы, так как в дальнейшем только небольшое число из них сохраняет способность нитрифицировать.

При более длительном изучении чистых культур обращает на себя внимание тот факт, что все они значительно менее активны в смысле окисления аммиака, чем смешанные культуры. Выше, когда шла речь о доказательствах чистоты культуры, было указано два метода — посевы и микроскопия. С полным основанием одним из признаков чистоты культуры следует считать падение нитрифицирующей активности у этих культур. Это положение подтверждается данными, приведенными в табл. 1. В ней указана динамика накопления нитритов в смешанных и чистых культурах Nitrosomonas. Такая сравнительная оценка дана параллельно на среде Виноградского и Майклджон.

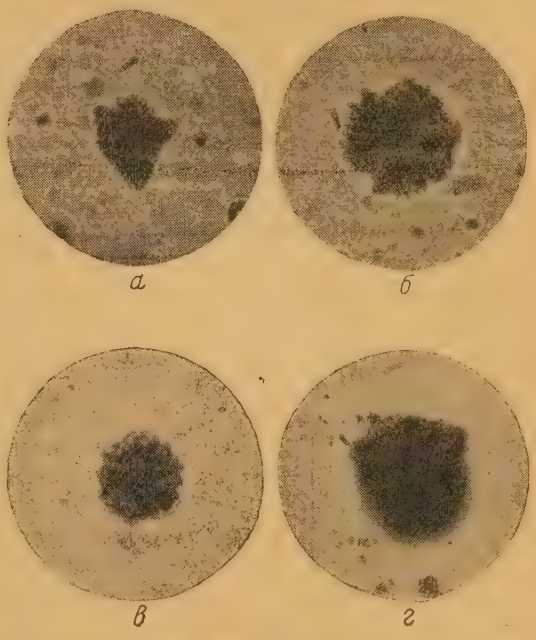


Рис. 2. Глубинные колонии Nitrosomonas в толще кремнекислого геля. Чистая культура. Ув. × 120.

а—темнобурая плотная колония с резким контуром, возраст 8 суток; б — желтоватая колония, плотная в центре с зачинающейся зернистостью по краям, возраст 10 суток; в—рыхлая желтая колония крупнозернистого строения, возраст 12 суток; г—мелкозернистая светлая, возраст 16 суток

Мы видим, что независимо от состава питательной среды в чистых культурах Nitrosomonas нитриты закономерно появляются в чистой культуре позднее и количество накапливающихся нитритов в обогащенных (смешанных) культурах постоянно больше.

Аналогичная картина наблюдается при посевах чистой и смешанной культуры на пластинки кремнекислого геля. Смешанные культуры довольно быстро образуют зоны растворения мела, внешний вид которых

Таблица 1

Активность чистых и обогащенных культур

(Посев был произведен 29.V)

№ культуры	2.VI		6.VII		10.VII		14.VI		18.VI		28.VI	
	В	М	В	М	В	М	В	М	В	М	В	М
64 чистая	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	+	+	+	+	+
74 „	—	сл	сл	сл	сл	сл	сл	+	сл	+	+	+
217 „	—	сл	сл	сл	сл	сл	сл	+	+	+	+	+
235 смешанная	+	+	+	++	++	+++	+++	++++	+++	++++	+++	++++
64 „	+	+	+	++	++	+++	+++	++++	+++	++++	++++	++++
256 „	+	+	++	++	++	+++	+++	++++	+++	++++	++++	++++
148 „	+	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++

Обозначения. В — среда Виноградского; М — Майклджон; — отсутствие нитритов; сл — следы; + слабая; ++ умеренная; +++ сильная; ++++ очень сильная реакция на нитриты.

хорошо известен микробиологам (рис. 3). В противоположность этому при посеве чистых культур Nitrosomonas прозрачных зон не возникает вообще или эти зоны имеют вид прозрачных точек (рис. 3). Обычно же появляются только небольшие участки с углублениями в слое влажного мела. Это начальные стадии растворения мела на кремневой пластинке, и их можно сфотографировать только при проходящем свете (рис. 4).

Сопоставление активности чистых и смешанных культур Nitrosomonas на основании качественных реакций было дополнено количественными определениями накопления NO_2 в культурах колориметрическим методом. Результаты определений приведены в табл. 2.

Таблица 2

Количество NO_2 в мг/л, образованное смешанной и чистой культурой Nitrosomonas за 20 суток

Смешанная культура	Чистая культура
94,0	7,2
109,0	8,3
119,2	8,4
130,0	22,6
133,0	9,2
153,0	13,4
128,0	14,9
131,0	17,4
	16,2
Среднее 123,03	10,06

Как видно из приведенных данных, активность чистых культур в 12 раз ниже активности культур смешанных.

Данное явление лишний раз подтверждает общее положение, установленное одним из нас [3, 4], что элективные питательные среды экологически не оправданы. В них искусственно создаются условия, благоприятные для развития только одного вида с определенной физиологической функцией. Сам состав элективных сред исключает возможность интенсивного развития микроба, так как он неполноценен. В нем отсутствуют органический углерод и азотосодержание соединения и, повидимому, в первую очередь витамины, необходимые для хорошего роста представителя данной специализированной группы микроорганизмов. Сравнительное изучение чистых и смешанных культур убеждает в том, что бактерии-спутники изменяют состав питательной среды благоприятным образом. Разработка теоретически обоснованной оптимальной питательной среды для Nitrosomonas — задача будущих исследований. В этих исследованиях были сделаны попытки хотя бы немного усилить активность чистых культур нитрификаторов.

Для повышения энергии нитрификации в чистых культурах к обычным средам производилось добавление почвенной вытяжки, экстракта из старых листьев и травы по Макринову [6] дрожжевого автолизата, гуминовых веществ и торфа и фильтрата из автоклавированных культур бактерий-спутников.

Почвенная вытяжка приготовлялась путем настаивания в течение 12 часов 0,5 кг почвы в 1 л воды с последующим автоклавированием при 1 атм. в течение 20 минут. Она прибавлялась в количестве 1—2 мл на 5 мл среды. Экстракт из старых листьев и травы получался путем автоклавирования 10 г материала в 100 мл воды. Экстракт добавлялся в количестве 1 мл на 5 мл среды.

Дрожжевой автолизат приготовлялся путем автолиза 40 г четырехсуточных дрожжевых клеток в 100 мл стерильной воды при 40° в течение 48 часов. Последующая фильтрация осуществлялась сначала через воронку Бюхнера, а затем через свечу Шамберлена. Автолизат добавлялся в количестве 0,1 мл на 5 мл среды.

Гуминовые вещества торфа получались путем обработки торфа 20-кратным объемом 2%-ной щелочи, фильтрованием и осаждением веществ из фильтрата 10%-ной соляной кислотой. После отмывания осадка от хлора гуминовые вещества высушивались и сохранялись в виде порошка. Перед употреблением гуминовые вещества торфа в количестве 0,1% растворялись в 2%-ном растворе щелочи. Раствор ней-

трализовался уксусной кислотой и употреблялся после автоклавирования в количестве 1 мл на 5 мл среды.

В дальнейшем чистая культура Nitrosomonas и в качестве контроля обогащенная культура были посеяны в колбы, содержащие среду Майкл-джон (Meikeljohn [7]) с добавленными к ней различными вытяжками.

Результаты этих исследований приведены в табл. 3.

Таблица 3

Влияние добавления различных вытяжек на нитрификацию
(Посев был произведен 19.VI)

№ культуры	Дата	Контроль-среда М	Дорожжевой автолизат	Почвенная вытяжка	Экстракт по Макринову	Гуминовые вещества
	23.VI	—	—	—	—	сл
64	27.VI	сл	сл	сл	сл	+
	1.VII	сл	сл	сл	сл	+
	14.VII	сл	сл	сл	сл	++
	23.VI	сл	сл	сл	+	+
74	27.VI	сл	сл	сл	+	+
	1.VII	сл	сл	сл	+	++
	14.VI	сл	сл	сл	+	++
	23.VI	сл	сл	сл	—	—
217	27.VI	сл	сл	—	сл	сл
	1.VII	сл	+	сл	+	+
	14.VIII	сл	+	+	+	++
	23.VI	сл	сл	+	+	++
64 (обога-щенная)	27.VI	+	+	+	++	+++
	1.VII	+++	++	+++	+++	++++
	14.VII	++++	++++	++++	++++	++++

Условные обозначения см. в табл. 1.

Данные, приведенные в табл. 3, позволяют сделать следующие выводы: 1) дрожжевой автолизат и почвенная вытяжка не стимулируют жизнедеятельности Nitrosomonas; 2) слабое благоприятное влияние оказывает экстракт, приготовленный по Макринову [6]; 3) определенное повышение активности происходит при добавлении к среде гуминовых веществ; 4) интенсивность нитрификации в обогащенной (смешанной) культуре выше, чем в чистых культурах.

Дополнительными опытами выяснено, что благоприятный эффект гуматы оказывают только в том случае, если их содержание в среде выше 0,0025%. Производя добавление гуматов к среде, можно несколько улучшить условия для развития и биохимической активности Nitrosomonas. Было также установлено, что внесение в среду фильтрата автоклавированных культур бактерий, сопутствующих нитрификаторам, не оказывает благоприятного влияния на нитрифицирующих бактерий.

Наши сведения в области физиологии чистых культур Nitrosomonas крайне ограниченны и задача дальнейших исследований — выяснить причину стимулирующего влияния, оказываемого бактериями, спутниками, на процесс нитрификации.

Выводы

1. Выделение чистых культур Nitrosomonas возможно двумя методами. При первом производится посев накопительной культуры в жидкий, еще не застывший кремнекислый гель. Отсев из появляющихся в дальнейшем глубинных колоний позволяет получить чистые куль-

туры. Второй способ основан на перенесении мельчайших капелек, сделанных из накопительной культуры при помощи микропипетки на предметном стекле, в стерильную питательную среду для нитрификатов.

2. Ни одна из девяти выделенных чистых культур Nitrosomonas не дала роста на самых различных по своему составу питательных средах.

3. Чистые культуры Nitrosomonas гораздо менее активны, чем накопительные. Такое ослабление нитрифицирующей способности — один из признаков чистоты культуры.

4. Добавление к элективным средам для нитрификаторов дрожжевого автолизата и почвенной вытяжки не стимулировало жизнедеятельности Nitrosomonas. Слабый эффект дало добавление экстракта из листьев. Закономерное усиление процесса нитрификации наблюдалось при внесении в среду гуминовых веществ.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Получено 18.IX.1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградский С. Микробиология почвы. Изд-во Акад. наук СССР, М., 1952.
2. Имшенецкий А. Нитрифицирующие бактерии и миксобактерии. Микробиология, XIV, вып. 3, 1945.
3. Имшенецкий А. Оптимальные питательные среды для анаэробных целлюлозных бактерий. Микробиология, XVIII, вып. 3, 1949.
4. Имшенецкий А. Оптимальные питательные среды для десульфурирующих бактерий. Микробиология, XVIII, вып. 4, 1949.
5. Комарова Л. Пипетка для выделения культур из одной клетки. Микробиология, XVIII, вып. 4, 1949.
6. Макринов И. Цит. по Омелянскому. В. Л., Практическое руководство по микробиологии, 1940, стр. 190.
7. Meikeljohn I. The pure culture isolation of Nitrosomonas europea. Trans. Fourth Int. Congr. Soil. Sci., 1, 195, 1950.

НОВЫЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА

М. Н. Мейсель и *Н. П. Трофимова*

В последнее время широкое развитие и применение получили микробиологические методы количественного определения витаминов и аминокислот. Углубленное исследование физиологии питания различных групп микроорганизмов позволило выявить определенные культуры бактерий, дрожжевых и плесневых грибов, водорослей и Protozoa, специфически реагирующих на те или иные витамины или аминокислоты. Для определения аминокислот используются преимущественно молочнокислые бактерии (Работнова [4], Иерусалимский [1], Мардашев [2] Dunn [5]). Эти бактерии характеризуются весьма сложными потребностями в аминокислотах, пуриновых основаниях и витаминах. Вследствие этого в состав питательных сред для индикаторных молочнокислых бактерий должны входить многочисленные аминокислоты (до 18), витамины (до 10), аденин, гуанин, урацил и ксантин. Само собой разумеется, что эти соединения должны быть химически чистыми. Все это чрезвычайно осложняет и удорожает микробиологические методы и препятствует их распространению в исследовательской и практической работе. Насущной задачей поэтому является максимальное упрощение микробиологических методов с сохранением присущей им специфичности, точности и чувствительности.

Мы уже указывали на то, что дрожжевые организмы как индикаторы на витамины имеют несомненные преимущества перед бактериями (Мейсель, Помощникова и Трофимова [3]). Очевидно, что это в равной мере относится и к микробиологическим методам определения аминокислот. Дрожжи менее требовательны к составу питательной среды, с ними значительно проще экспериментировать, размножение их легче учитывать, и, наконец, что особенно существенно для практики, дрожжевые культуры без особого труда могут быть предохранены от инфицирования посторонними микроорганизмами.

Однако большинство дрожжевых организмов все же нуждается в получении извне нескольких витаминов и активируется аминокислотами и некоторыми другими органическими соединениями, встречающимися в природных продуктах. Мы считаем поэтому необходимым для получения достаточно точной и специфичной реакции дрожжевых культур на аминокислоты и витамины прибавление к искусственной сахаро-минеральной среде аминокислот и витаминов, но не в виде чистых, индивидуальных веществ, а путем введения естественных источников этих веществ (автолизатов, гидролизатов).

В самом общем виде предлагаемый нами принцип состоит в том, что к наиболее простой сахаро-минеральной среде добавляется в качестве источника аминокислот, витаминов и других биологически активных веществ дрожжевой автолизат, из которого тем или иным способом предварительно удалены подлежащие количественному определению витамин или аминокислота. Некоторые витамины и аминокислоты могут быть, как известно, более или менее избирательно разрушены путем окисления, гидролиза, облучения ультрафиолетовыми лучами или удалены из раствора при помощи адсорбции в определенных условиях.

При разработке микробиологического метода определения триптофана мы воспользовались ультрафиолетовым облучением дрожжевого автолизата. При этом довольно легко разрушался триптофан и не затрагивались витамины и аминокислоты, необходимые для развития и размножения индикаторной дрожжевой культуры. Следовательно, наш метод освобождает от необходимости иметь разнообразные вещества в чистом виде для составления сложных питательных сред, что значительно упрощает всю работу. В качестве индикаторного организма мы использовали Saccharomyces cerevisiae. Нами селекционирован штамм Т-1, который для своего размножения, помимо биотина и пантотеновой кислоты, требует обязательного присутствия в среде триптофана. Витаминограмма, приведенная в табл. 1, показывает, что ни один из испытанных водорастворимых витаминов не может заменить для нашего индикаторного организма триптофан. Вместе с тем из витаминограммы видно, что Sacch. cerevisiae Т-1 нуждается в получении извне биотина и пантотеновой кислоты. Особенно существенно то обстоятельство, что ни никотиновая кислота, ни витамин B_6, которые связаны с процессами биосинтеза и биохимических превращений триптофана, не заменяют этой аминокислоты в обмене веществ нашего индикаторного организма.

Таблица 1

Витаминограмма культуры Saccharomyces cerevisiae Т-1

Основная среда	Добавлены витамины								Рост культуры
	B_1	B_2	B_6	биотин	пантотеновая к-та	никотиновая к-та	парааминобензойная к-та	инозит	
Среда Ридер	+	+	+	+	+	+	+	+	Нет
То же + триптофан	+	+	+	+	+	+	+	+	Есть
Среда Ридер	—	+	+	+	+	+	+	+	Нет
То же + триптофан	—	+	+	+	+	+	+	+	Есть
Среда Ридер	+	—	+	+	+	+	+	+	Нет
То же + триптофан	+	—	+	+	+	+	+	+	Есть
Среда Ридер	+	+	—	+	+	+	+	+	Нет
То же + триптофан	+	+	—	+	+	+	+	+	Есть
Среда Ридер	+	+	+	—	+	+	+	+	Нет
То же + триптофан	+	+	+	—	+	+	+	+	„
Среда Ридер	+	+	+	+	—	+	+	+	„
То же + триптофан	+	+	+	+	—	+	+	+	„
Среда Ридер	+	+	+	+	+	—	+	+	„
То же + триптофан	+	+	+	+	+	—	+	+	Есть
Среда Ридер	+	+	+	+	+	+	—	+	Нет
То же + триптофан	+	+	+	+	+	+	—	+	Есть
Среда Ридер	+	+	+	+	+	+	+	—	Нет
То же + триптофан	+	+	+	+	+	+	+	—	Есть
Среда Ридер	—	—	—	—	—	—	—	—	Нет
То же + триптофан	—	—	—	—	—	—	—	—	„

Примечание. Состав сахаро-минеральной среды Ридер — см. в тексте. + обозначает, что витамин добавлен; — обозначает, что витамин не добавлен.

Существенно было установить, в какой мере потребность индикаторного дрожжевого организма в триптофане специфична, не может ли эта аминокислота синтезироваться при наличии в питательной среде других аминокислот или сложных соединений азота. Для выяснения этого были поставлены специальные опыты, сведенные в табл. 2. В ряде опытов был использован кислотный гидролизат казеина; освобожденный от витаминов, он содержал все аминокислоты, кроме триптофана и цистина. Гидролизат дрожжевой нуклеиновой кислоты был испытан как источник пуриновых и пиримидиновых оснований.

Таблица 2

Потребность Saccharomyces cerevisiae Т-1 в сложных соединениях азота при культивировании на среде Ридер с биотином и пантотеновой кислотой (основная среда)

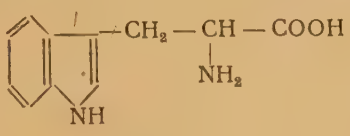
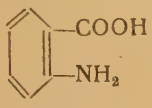
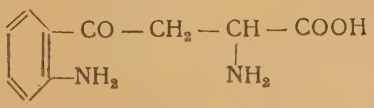
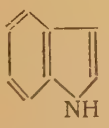
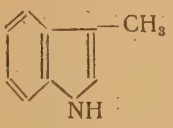
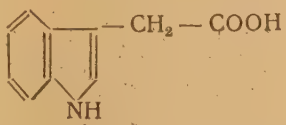
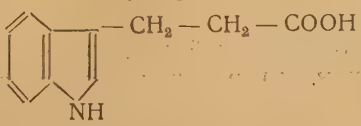
	Добавлены					Рост культуры
	кислотный гидролизат казеина	цистин	тимин	дрожжевая нуклеиновая кислота	триптофан	
Основная среда	—	—	—	—	—	Нет
	+	—	—	—	—	„
	+	+	—	—	—	„
	+	+	+	+	—	„
	+	+	+	+	+	Есть
	—	—	—	—	+	„

Примечание. + обозначает наличие в среде данного вещества; — его отсутствие.

Результаты опытов показывают, что ни одна из аминокислот, входящих в состав гидролизата казеина, не заменяет триптофана и не способствует его биосинтезу. То же относится и к пуриновым и пиримидиновым основаниям.

Таблица 3

Отношение Saccharomyces cerevisiae Т-1 к производным и продуктам превращения триптофана

Вещество	Структурная формула	Рост культуры
Триптофан		Обильный рост
Антраниловая к-та		Роста нет
Кинуренин		„ „
Индол		Обильный рост
Скатол (метилиндол)		Роста нет
Индолилуксусная к-та		„ „
Индолилпропионовая к-та		„ „

Необходимо было выяснить отношение индикаторного организма к производным и продуктам превращения триптофана, встречающимся в тканях и продуктах выделения растений и животных. Нами была испытана биологическая активность антраниловой кислоты, индола, скатола, индолил-3-пропионовой кислоты, индолил-3-уксусной кислоты и кинуренина. Будучи добавлены к сахаро-минеральной среде Ридер, содержавшей биотин и пантотеновую кислоты (а в отдельных опытах и безвитаминный кислотный казеин гидролизат), эти соединения, кроме индола, не способствовали росту и размножению культуры Sacch. cerevisiae T-1, как это видно из табл. 3.

Следовательно, из всех испытанных соединений только индол может заменить триптофан в питании Sacch. cerevisiae T-1. Очевидно, только из индола, а не из каких-либо иных близких к индолу веществ этот организм может синтезировать триптофан. Индол может мешать при определении триптофана, поэтому его необходимо удалять из испытуемых образцов.

Это легко осуществляется экстракцией серным эфиром; индол при этом переходит в эфирную фракцию; триптофан остается в водной фракции. Таким образом, имеются все основания для того, чтобы использовать Sacch. cerevisiae T-1 при обнаружении и количественном определении триптофана; специфичность реакции этой культуры на триптофан оказалась весьма высокой. Требовалось еще доказать, что этот организм также количественно реагирует на присутствие в среде триптофана. Такое доказательство нами было получено в результате сопоставления интенсивности нарастания культуры с количеством триптофана в среде.

Чтобы получить полноценную для определения триптофана питательную среду без специального внесения в нее витаминов и аминокислот, мы прибавляли, как уже отмечалось, к сахаро-минеральному раствору Ридер дрожжевой автолизат, освобожденный от триптофана. Освобождение от триптофана достигалось ультрафиолетовым облучением автолизата в тонком слое. Открытые чашки Петри с 10—12 мл 5%-ного дрожжевого автолизата (из расчета на сухие дрожжи) помещались под обычную ртутно-кварцевую медицинскую лампу (горелка ПРК-2) на расстояние в 25 см от горелки и облучались в течение шести часов. Объем испаряющейся жидкости периодически возмещался добавлением дестиллированной воды. По окончании облучения проводилась качественная проба на триптофан (в пробирку с 1 мл облученного автолизата добавляется 2—3 мл ледяной уксусной кислоты, все тщательно перемешивается и затем осторожно наслаивается крепкая серная кислота; в случае присутствия триптофана появляется фиолетовое кольцо). Как правило, после шестичасового облучения дрожжевого автолизата качественная проба на триптофан дает отрицательный результат и такой автолизат без прибавления триптофана недостаточен для роста и размножения культуры Sacch. cerevisiae T-1.

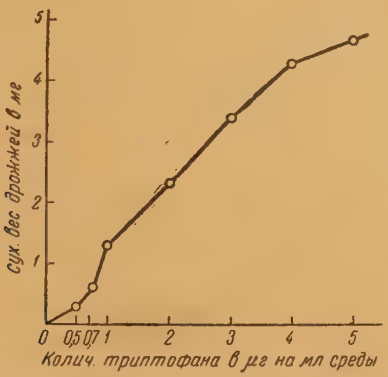
На основании изложенных выше опытов для получения стандартной кривой и для количественного определения триптофана может быть предложена следующая среда: сахаро-минеральный раствор Ридер на водопроводной воде (сахарозы — 2%, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,3%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,07%; NaCl — 0,05%; $Ca(NO_3)_2$ — 0,04%; KH_2PO_4 — 0,1%; K_2HPO_4 — 0,01%; облученного дрожжевого автолизата — 0,5%).

Среда разливается по 10 мл в 50 мл эрленмейеровские колбочки и стерилизуется в автоклаве (0,5 атм). К среде прибавляют стерильный водный раствор триптофана (для составления стандартной кривой) или испытуемая жидкость (щелочной или ферментативный гидролизат, автолизаты, экскреты и т. п.) в таких количествах, чтобы окончательная концентрация триптофана в среде не превышала 5 μг/мл.

Индикаторная культура поддерживается на сусло-агаре. Непосред-

ственно перед опытом из двухсуточной культуры готовится сильно разведенная, дающая едва заметную муть суспензия на стерильной водопроводной воде. Из этой суспензии стерильной пипеткой вносится по одной капле в колбочку с питательной средой. Колбочки помещаются в термостат при температуре 28° на 36 часов. Нарастание массы культуры учитывается либо нефелометрически, либо весовым способом. В последнем случае содержимое колбочек фильтруется в маленьких приборах Зейтца (диаметр 15—16 мм) через мембранные фильтры (предварительные или № 3), фильтры высушиваются в сушильном шкафу при 70° в течение 5—6 часов и взвешиваются.

Прибавление к этой среде определенных количеств триптофана позволило составить необходимую стандартную кривую (рисунок). Из этой



Стандартная кривая, изображающая нарастание культуры в миллиграммах сухого веса в 10 мл среды за 36 часов в зависимости от содержания триптофана (в мг / мл в среде)

стандартной кривой следует, что индикаторный организм Sacch. cerevisiae T-1 количественно реагирует на триптофан в интервале концентраций от 0,5 μг до 5 μг в 1 мл. Таким образом, чувствительность нашего индикаторного организма не уступает таковой, установленной для Lactobacillus mesenteroides P-60.

Практическая проверка предлагаемого метода была проведена нами путем определения содержания триптофана в освобожденном от витаминов казеине. Для этого казеин подвергался щелочному гидролизу с 5 N NaOH, в запаянных ампулах при 110° в течение 5 часов. Полученный гидролизат подкислялся до pH = 6,8 и добавлялся к описанной нами питательной среде с таким расчетом, чтобы в каждом миллилитре содержалось 3 μг триптофана (теоретический расчет производился на основе известного количественного содержания триптофана в казеине). Микробиологические определения при помощи нашего индикаторного организма дали вполне совпадающие результаты с теоретически вычисленным содержанием триптофана.

Выводы

1. Селекционирован дрожжевой организм Saccharomyces cerevisiae T-1, нуждающийся для своего нормального развития в получении извне биотина, пантотеновой кислоты и триптофана (или индола).

2. Предложен способ избирательного разрушения триптофана ультрафиолетовым светом с сохранением в питательной среде (дрожжевом автолизате) необходимых для индикаторного организма витаминов.

3. Разработан простой микробиологический метод количественного определения триптофана, не требующий для своего осуществления сложных питательных сред и чистых препаратов витаминов и аминокислот.

4. Специфичность метода подверглась специальной проверке. Индикаторный организм не реагирует в отсутствие триптофана ни на один из испытанных витаминов и ни на одну из аминокислот. Индол, на который также получается положительная реакция, может быть удален экстракцией эфиром.

5. Чувствительность метода достаточно высока (начиная с 0,5 γ/мл).

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Получено 7.V.1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иерусалимский Н. Д. Азотное и витаминное питание микробов. Изд. Акад. наук СССР, М., 1949.
2. Мардашев С. Р. Микробиологические и энзиматические методы количественного определения аминокислот. Успехи биол. химии (ежегодник), 1, стр. 281, 1950.
3. Мейсель М. Н., Помощникова Н. А. и Трофимова Н. П. Биологический синтез пантотеновой кислоты из β-аланина и некоторых его производных. Биохимия, 14, стр. 361, 1949.
4. Работнова И. Л. Микроорганизмы как реагенты при количественном определении витаминов и аминокислот. Успехи совр. биол., 23, стр. 305, 1947.
5. Dunn M. Determination of amino acids by microbiological assay. Physiological Reviews, 29 (3), 219, 1949.

ВЛИЯНИЕ УГЛЕКИСЛОТЫ НА РОСТ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

С. А. Баринова

В настоящее время уделяется много внимания вопросу о влиянии углекислоты на жизнедеятельность различных гетеротрофных микроорганизмов.

Углекислый газ в физиологическом отношении не является, вопреки прежним представлениям, безразличным инертным газом, наоборот, в малых концентрациях он оказывает стимулирующее действие на рост многих микроорганизмов, а в больших концентрациях он является сильно действующим ядом, обладающим явно выраженными анастетическими свойствами [7].

Впервые Лебедев [6] наблюдал, что прирост сухого вещества у Aspergillus niger увеличивается с повышением концентрации углекислоты (от 0,5 до 20%) в атмосфере, окружающей гриб.

Риппель и Хейльман [10] показали, что углекислота воздуха в нормальной концентрации (0,03% по объему) ускоряет набухание конидий плесневых грибов, вследствие чего наступает быстрее развитие мицелия. При этой концентрации достигается уже половина максимального действия углекислоты.

Аристовская [1, 2] и Селибер [9] установили, что Asp. oryzae и Asp. niger на питательной среде с маннитом не нуждаются для своего развития в углекислоте.

Понтович [8], начиная продувания культур через сутки после посева, не обнаружила заметных отличий в росте поверхностной культуры Asp. flavus при продувании питательной жидкости обычным воздухом и воздухом, лишенным углекислоты. Ускорение роста гриба имело место только при продувании газовой смесью с 5% углекислоты.

Стейнберг [11] наблюдал положительное действие углекислоты на рост. Asp. niger на средах с аммиачным азотом только при удалении из питательной среды железа, на средах с нитратами влияние ее проявлялось при удалении из среды цинка, меди, молибдена или галлия.

Никитинский [7] и его сотрудники Каюкова, Загорянский и другие, изучив влияние углекислоты на рост микроорганизмов, разработали способ хранения пищевых продуктов в атмосфере с повышенным содержанием углекислоты. Каюкова [5] обнаружила, что 10% углекислоты в воздухе, за исключением Asp. ochraceus, тормозит рост Rh. nigricans, Rh. oryzae, Asp. candidus, Asp. glaucus, Asp. fumigatus и Fusarium. В опытах Загорянского [3] такая же концентрация углекислоты тормозила рост Penicillium italicum, Asp. niger, Mucor stolonifer и Pen. glaucum.

Журавский [4], протягивая над питательной средой газовые смеси, содержащие различное количество углекислоты, обнаружил, что углекислота угнетает рост и развитие Asp. niger особенно сильно в количестве 15—20%, однако гриб медленно растет даже при 70% CO_2 в газовой смеси.

Из вышеизложенного видно, что относительно потребности плесневых грибов в углекислоте не существует единого мнения. Вследствие этого мы начали свою работу по выяснению значения углекислоты для жизнедеятельности грибов и для образования ими органических кислот с установлением влияния ее на их рост.

Влияние углекислого газа на рост плесневых грибов изучалось с несколькими видами грибов, различающимися по морфологическим и по некоторым физиологическим свойствам.

Методика

Опыты проводились с погруженными культурами Asp. niger, Asp. flavus, Rh. nigricans и Pen. chrysogenum на качалке, вращающейся со скоростью 120—150 оборотов в одну минуту. Воздух, во избежание зарастания трубок, протягивался над пи-

тательной жидкостью со скоростью 9 л в час. Вследствие такого метода воздуха давалось значительно больше на объем питательной среды, чем обычно при продувании сквозь жидкость. В колбы емкостью 250 мл наливалось 40 мл питательного раствора, который при взбалтывании на качалке распределялся тонким слоем по стенкам колбы, благодаря чему имела место хорошая аэрация среды.

В культуры, выращиваемые без углекислоты, поступал воздух, предварительно освобожденный от нее путем пропускания через две склянки с пористыми пластинками, наполненными 30%-ным едким калием, и затем, в качестве контроля, через склянку с едким барием. Скорость пропускания воздуха регулировалась при помощи реометров. Чтобы уменьшить испарение питательной жидкости из колб, воздух увлажнялся пропусканием через две склянки с водой, для культур, выращиваемых без углекислоты, употреблялась вода, освобожденная от углекислоты. После чего воздух стерилизовался через ватный фильтр, помещенный в отводные трубки колб. Опытные колбы засевались конидиями, полученными с сусло-агара из расчета 500 000 на 1 мл питательной среды. Опыты проводились при 30—32° в течение 12—72 часов с 3—4 параллельными колбами. Мицелий отфильтровался на стеклянных фильтрах, промывался и затем высушивался при 80° до постоянного веса. Сахара определялись по Бертрану.

Грибы выращивались на трех питательных средах. Asp. niger в большинстве опытов выращивался на среде № 1 (Буткевича). Состав среды: NH_4NO_3 — 0,3%, KH_2PO_4 — 0,066%, $MgSO_47H_2O$ — 0,033%, $FeCl_36H_2O$ — 0,003%, $ZnSO_47H_2O$ — 0,004%, $MnSO_47H_2O$ — 0,001%, $KH_2PO_4 + K_2HPO_4$ (1 : 1) по 0,025%, глюкозы — 0,75%. $KH_2PO_4 + K_2HPO_4$ стерилизовались отдельно.

Rh. nigricans и Pen. chrysogenum выращивались на среде № 2. Состав ее: $(NH_4)_2SO_4$ — 0,3%, глюкоза — 2—5%, остальные соли, как в среде № 1, pH до 6,2 с NaOH.

Для выращивания Asp. flavus в основном применялась среда № 3 (Таусона). Состав ее: $Ca(NO_3)_2$ — 0,1%, KNO_3 — 0,025% [1], $MgSO_47H_2O$ — 0,025%, $Fe_2(SO_4)_3$ — 0,001%, $KH_2PO_4 + K_2HPO_4$ (1 : 1) по 0,025%. глюкозы — 0,75%. $KH_2PO_4 + K_2HPO_4$ стерилизовались отдельно.

Питательные среды в опытах с удалением углекислоты после стерилизации охлаждались в атмосфере, лишенной углекислоты.

Влияние углекислоты воздуха на рост Asp. niger

Asp. niger выращивался на двух питательных средах в течение 20—70 часов. В среду № 1 вносилось, в зависимости от продолжительности опыта, 0,75, 2 и 5% сахарозы и в среду № 3, как указано в методике, 0,75% глюкозы. Кислотность на среде № 1 к концу опыта повышалась от pH 4,3 до pH 2,5—2,0 и на среде № 3, благодаря образованию щавелевой кислоты, от pH = 6,8 до pH = 4,5.

Конидии Asp. niger на обеих средах начинают набухать в колбах, снабжаемых обычным воздухом, содержащим углекислоту, приблизительно через 5 часов и прорастать через 6—7 часов после посева. Спустя 8 часов после посева прорастает большинство конидий, в это время длина гиф почти в два раза больше диаметра набухших конидий. На тех же средах при удалении из воздуха углекислоты набухание конидий начинается позднее, приблизительно, через 9 часов и прорастание через 10—11 часов после посева. Следовательно, углекислота, находящаяся в воздухе, стимулирует первые стадии роста Asp. niger, а именно набухание и прорастание конидий на описанных средах ускоряются приблизительно на 4 часа.

По мере роста гриба углекислота, выделяемая самим грибом при дыхании, повидимому, заменяет углекислоту, вносимую с воздухом, вследствие чего разница между культурами постепенно уменьшается. Несмотря на это, вызванное углекислотой воздуха ускорение набухания и прорастания отчетливо видно на односуточных и трехсуточных культурах (табл. 1). Вес односуточных культур, в которые продувался воздух, содержащий углекислоту, на 400—300%, а вес трехсуточных культур на 25% больше, чем вес грибов, снабжаемых воздухом, лишенным углекислоты.

В другом опыте разница в весе односуточных культур, выращиваемых на среде № 3, была значительно меньше, она составляла 74%.

Обнаружив, что углекислота воздуха стимулирует первые стадии роста Asp. niger, мы решили установить, сколько времени необходимо

Таблица 1

Влияние углекислоты воздуха на рост Asp. niger

(В начале опыта pH = 4,3 в опыте № 1 и 2; pH = 6,8 в опыте № 3)

№ опыта	Продолжительность опыта в час	Питательная среда	Продуваемый воздух: без CO_2 — pH в конце опыта	без CO_2 — вес гриба в мг	без CO_2 — потребленный сахар в мг	без CO_2 — экономич. коэффициент	с CO_2 — pH в конце опыта	с CO_2 — вес гриба в мг	с CO_2 — потребленный сахар в мг	с CO_2 — экономич. коэффициент	Отношение веса гриба без CO_2 к весу с CO_2. Вес гриба без CO_2 принят за 100
1	23	№ 1, сахар 0,75%	2,4	10,4	36,1	28,8	2,2	51,9	107,7	48,1	100 : 499,0
	23	№ 1, сахар 3 %	2,3	11,2	186,2	6,0	2,3	46,4	212,6	17,6	100 : 414,3
2	70	№ 1, сахар 5%	2,0	486,5	1571,0	30,9	1,9	605,8	1827,0	33,1	100 : 124,5
3	20	№ 3, глюкоза 0,75%	4,5	11,6	40,2	28,8	4,5	20,2	78,2	25,8	100 : 174,1

давать воздух, содержащий углекислоту, чтобы при удалении ее не ощущался недостаток в ней при дальнейшем росте гриба.

В опыте, поставленном для решения указанного вопроса, мы прекращали снабжение культур углекислотой воздуха спустя 5 и 8 часов после посева, т. е. когда конидии набухают, и в другом случае, когда они прорастают.

Как видно из табл. 2, удаление углекислоты из воздуха через 5 часов после посева во время набухания конидий тормозит дальнейший рост гриба, или, другими словами, стимулирование роста углекислотой воздуха продолжается и после начала набухания конидий, что приводит к увеличению веса гриба на 157% по сравнению с культурой, в которую прекратили подавать углекислоту воздуха.

Таблица 2

Влияние углекислоты на рост набухших и проросших конидий Asp. niger

(Питательная среда № 1 с 2% сахара, продолжительность опыта 24 часа. pH=4,0 в начале опыта)

Подача воздуха	Продуваемый воздух: без CO_2 — pH в конце опыта	без CO_2 — вес гриба в мг	без CO_2 — потребленный сахар в мг	без CO_2 — экономич. коэффициент	с CO_2 — pH после опыта	с CO_2 — вес гриба в мг	с CO_2 — потребленный сахар в мг	с CO_2 — экономич. коэффициент	Отношение веса гриба без CO_2 к весу с CO_2. Вес гриба без CO_2 принят за 100
После начала набухания	2,7	19,1	81,9	23,3	2,3	49,2	212,6	23,1	100 : 257,6
После начала прорастания . . .	2,3	49,6	134,9	36,7	2,1	58,4	189,9	30,7	100 :117,7

В другом случае мы прекращали снабжение углекислотой воздуха во время прорастания конидий, когда образовавшиеся гифы были почти в два раза больше диаметра набухших конидий. Удаление углекислоты из воздуха в этот период роста почти не отразилось на дальнейшем росте гриба, вероятно, вследствие того, что углекислота, выделяемая

проросшими конидиями, почти полностью удовлетворяла потребность гриба (табл. 2).

В культурах, помимо веса гриба, определялось потребление сахаров и вычислялся: экономический коэффициент, представляющий собой отношение веса гриба к потребленному сахару, выраженному в процентах.

Из табл. 1 видно, что в одном и том же опыте (№ 1) экономический коэффициент уменьшается с увеличением содержания сахара в питательной среде.

В опытах № 2 и 3, в которых различие в весе между грибами, снабжаемыми углекислотой воздуха и лишенными таковой, небольшое, экономические коэффициенты близки между собой. И наоборот, экономические коэффициенты сильно отличаются, если в опытах имеет место большая разница между весом гриба, выращиваемого при продувании воздуха с углекислотой, и воздуха, освобожденного от нее. Так как набухание и прорастание конидий в культурах, лишенных углекислоты, начинается позднее, чем в культурах, продуваемых обычным воздухом, и первые культуры еще не успели догнать последние, то мы сравниваем грибы, различные по возрасту, и следовательно различные и по интенсивности дыхания и по химическому составу. Известно, что в молодом возрасте гриб энергичнее дышит и содержит больше веществ образующихся из сахаров с малым коэффициентом использования (белки, липоиды и жиры) по сравнению со старыми грибами (оболочки гиф и крахмал).

Влияние углекислоты воздуха на рост Asp. flavus

Для сравнения с результатами опытов Понтович [8] мы выращивали Asp. flavus, так же как и она, на питательной среде Таусона в течение 24—72 часов. Исходная реакция этой среды — 6,8 и затем по мере потребления грибом иона NO_3 из $Ca(NO_3)_2$ и из KNO_3 постепенно подщелачивалась.

Конидии Asp. flavus на питательной среде № 3 при продувании воздуха, содержащего обычное количество углекислоты, начинают набухать через 6 часов и прорастать через 7—8 часов после посева, на той же среде при продувании воздуха, освобожденного от углекислоты, набухание конидий сильно замедляется и прорастание начинается приблизительно через 21—23 часа.

Таким образом, ускорение набухания и прорастания конидий Asp. flavus углекислотой воздуха значительно больше, чем ускорение Asp. niger, оно равняется приблизительно 14—15 часам.

Из табл. 3 видно, что наблюдаемое ускорение роста гриба под влиянием углекислоты резко еще проявляется через 72 часа после посева. Масса гриба, образовавшаяся в колбах, снабжаемых углекислотой воздуха, за 24 и 48 часов на 838—679%, а за 72 часа на 68% больше, чем вес грибов в соответствующих колбах, продуваемых воздухом без углекислоты.

Таблица 3

Влияние углекислоты на рост Asp. flavus

(В начале опыта № 1 pH=6,8, № 2 pH=6,3 и в остальных pH=4,3)

Продолжительность опыта в часах	Содержание глюкозы в среде в %	Продуваемый воздух								Отношение веса гриба без CO_2 к весу с CO_2. Вес гриба без CO_2 принят за 100
		без CO_2				с CO_2				
		pH в конце опыта	вес гриба в мг	потребленная глюкоза в мг	экономич. коэффициент	pH в конце опыта	вес гриба в мг	потребленная глюкоза в мг	экономич. коэффициент	
28	0,75	5,8	3,9	19,9	19,5	6,8	36,6	85,8	61,2	100 : 938,5
24	0,75	6,3	3,0	29,1	10,1	6,6	22,3	42,5	52,4	100 : 743,3
25	2,0	—	Конидии только наклюнулись			6,3	11,2	104,0	10,7	—
48	2,0	6,5	17,7	123,8	14,2	6,9	137,9	472,5	37,0	100 : 779,1
72	2,0	7,0	113,8	435,5	33,9	7,4	191,7	721,9	26,5	100 : 168,6
96	2,0	7,8	184,4	725,1	25,4	Опыт прекращен, так как использована вся глюкоза				

Экономический коэффициент (как и в предыдущем опыте с Asp. niger), культур, выращенных при продувании воздуха, лишенного углекислоты, ниже экономического коэффициента культур с CO_2. Объяснение причин этого явления, данное при описании опытов с Asp. niger, находит свое подтверждение в том, что экономические коэффициенты фактически одновозрастных культур, т. е. односуточных культур, выращенных с углекислотой воздуха, и двухсуточных грибов, культивируемых без углекислоты, т. е. культур, достигших приблизительно одного и того же веса, равны между собой (табл. 3).

Влияние углекислоты воздуха на рост Rh. nigricans

Rhizopus nigricans выращивался на питательной среде № 2 с 5% глюкозы в течение 12—48 часов, во время роста гриба кислотность этой среды вследствие потребления иона NH_4 из сернокислого аммония повышалась от pH 6,2 до 2,2.

Споры Rh. nigricans на питательной среде, снабженной углекислотой воздуха, начинают набухать приблизительно через 4 часа и прорастать через 5—6 часов после посева. На той же питательной среде при удалении углекислоты из воздуха набухание спор начинается приблизительно спустя 5 часов и прорастание через 6—7 часов после посева. Таким образом, стимулирование углекислотой воздуха набухания и прорастания спор Rh. nigricans значительно меньше, чем у других исследуемых грибов, и равняется одному часу. Благодаря этому разница в весе грибов очень небольшая и сохраняется относительно короткое время, так, через 24 часа после посева различия между культурами, выращиваемыми с углекислотой и без нее, уже не имеется.

Чтобы обнаружить ускорение роста углекислотой воздуха, приходится сокращать продолжительность опыта до 12 часов. За это время вес гриба в колбах, продуваемых воздухом с углекислотой, выше на 20%, чем вес в колбах, снабжаемых воздухом без углекислоты (табл. 4).

Таблица 4

Влияние углекислоты на рост Rh. nigricans

(Среда № 2 с 5% глюкозы; pH = 6,2 в начале опыта)

Продолжительность опыта в часах	Содержание глюкозы в %	Продуваемый воздух								Отношение веса гриба без CO_2 к весу с CO_2. Вес гриба без CO_2 принят за 100
		без CO_2				с CO_2				
		pH в конце опыта	вес гриба в мг	потребленная глюкоза в мг	экономич. коэффициент	pH в конце опыта	вес гриба в мг	потребленная глюкоза в мг	экономич. коэффициент	
12	5	2,3	47,0	285,2	16,5	2,2	56,9	340,2	16,7	100 : 121,0
26	5	Не определялось	117,3	Не определялись				Не определялись		100 : 100,6
48	5	2,2	204,9	99,6	20,6	2,2	118,0 213,7	1004,9	21,2	100 : 104,3

Что касается степени использования глюкозы Rh. nigricans, т. е. экономического коэффициента, то результаты этого опыта полностью подтверждают закономерности, выявленные в предыдущих опытах, так, например, экономические коэффициенты в культурах, выращиваемых с углекислотой и без нее, повидимому, благодаря почти одинаковому весу сравниваемых грибов, одинаковы. Затем экономические коэффициенты выше у 48-часовой культуры, чем у 12-часовой.

Влияние углекислоты воздуха на рост Asp. niger, Asp. flavus, Rh. nigricans и Pen. chrysogenum

Изучая влияние углекислоты воздуха на рост Asp. niger, Asp. flavus и Rh. nigricans, мы установили разницу в степени стимулирования углекислотой воздуха набухания и прорастания конидий. Поскольку указан-

ная разница наблюдалась при выращивании грибов на различных питательных средах, то для решения вопроса, связана ли упомянутая разница в степени стимулирования с физиологическими свойствами изучаемых грибов или она обусловлена различным составом применяемых питательных сред, мы провели опыты по влиянию углекислоты воздуха на рост указанных грибов на одной и той же среде.

Помимо указанных грибов, в опыт был включен Pen. chrysogenum. Все грибы выращивались в течение 23 часов на питательной среде № 2, применяемой ранее для Rh. nigricans.

Результаты опыта, представленные в табл. 5, показывают, во-первых, что при культивировании в атмосфере, лишенной углекислоты, исследуемые грибы сильно отличаются друг от друга по скорости набухания и прорастания конидий, во-вторых ускорение набухания и прорастания конидий, вызываемое углекислотой воздуха, несмотря на применение одной и той же среды, не одинаково у разных грибов; оно наибольшее у грибов, относительно медленно прорастающих в атмосфере без углекислоты, как у Asp. flavus и Pen. chrysogenum, и наименьшее у грибов, относительно быстро прорастающих — Rh. nigricans. Аналогичная закономерность выявляется при сопоставлении урожая грибов, так, на средах, снабжаемых обычным воздухом, урожай Asp. flavus на 6100%, Pen. chrysogenum на 1405% и Asp. niger на 355% больше, чем урожай этих же грибов, выращенных на средах, продуваемых воздухом без углекислоты, в то же время вес Rh. nigricans в обоих случаях почти одинаков. Следовательно, различная степень стимулирования набухания и прорастания конидий исследуемых грибов углекислотой воздуха обусловлена их физиологическими свойствами.

Рост Asp. niger и Asp. flavus в газовой смеси, содержащей 1—10% углекислоты

После того как было обнаружено стимулирование роста изучаемых плесневых грибов углекислотой воздуха, естественно, возникла необходимость проследить, будет ли усиливаться это явление при увеличении содержания углекислоты в воздухе.

Опыты проводились с Asp. niger и Asp. flavus, Asp. niger выращивался на среде № 1 и № 3, Asp. flavus — на среде № 3.

Скорость продувания в опытах с Asp. niger была 6 л в час, с Asp. flavus — 6 л и 1 л в час, причем в первых двух случаях углекислоты содержалось около 1%, в последнем — около 6%, т. е. количество углекислоты в обоих случаях было одинаково.

Проведенные наблюдения за набуханием и прорастанием конидий Asp. niger и Asp. flavus привели к заключению, что увеличение содержания углекислоты в воздухе до 1% незначительно ускоряет набухание и прорастание конидий, но в дальнейшем (табл. 6) оно тормозит рост Asp. niger. Так, на среде № 1 с 5% сахара, где кислотность среды за 48 часов повысилась до pH-1,6, вес гриба меньше на 48%, а на среде № 3 с 0,75% глюкозы (кислотность среды повысилась до pH-4,8) ниже на 24%, чем урожай в культурах, снабжаемых обычным воздухом.

Asp. flavus растет одинаково при продувании обычным воздухом со скоростью 6 л в час и воздухом, содержащим 1% углекислоты.

Уменьшая скорость продувания до 1 л в час и оставляя количество вводимой углекислоты без изменения, т. е. добавляя ее к воздуху в количестве 6%, мы наблюдали различное действие углекислоты на урожай Asp. flavus. Если питательная среда в начале опыта была почти нейтральной и во время роста гриба подщелачивалась, то добавленная углекислота, понижая реакцию среды, способствовала лучшему росту гриба, который, повидимому при недостаточном притоке кислорода испытывал

Таблица 5

Влияние углекислоты на рост Asp. niger, Asp. flavus, Rh. nigricans и Pen. chrysogenum на среде № 2 с 2% глюкозы

(Продолжительность опыта 23 часа; p = 4,2 в начале опыта)

Гриб	Продуваемый воздух: без CO_2 — прорастание через	pH в конце опыта	вес гриба в мг	потребленная глюкоза в мг	экономич. коэффициент	с CO_2 — прорастание через	pH в конце опыта	вес гриба в мг	потребленная глюкоза в мг	экономч. коэффициент	Отношение веса гриба без CO_2 к весу с CO_2. Вес гриба без CO_2 принят за 100
Asp. niger	11 час	3,0	11,6	91,5	12,6	7 час	2,2	52,8	141,5	37,1	100 : 455,7
„ flavus	22 „	4,1	0,7	57,0	1,2	8 „	3,4	43,4	128,0	33,9	100 : 6200,0
Rh. nigricans	7 „	2,2	70,6	277,6	25,4	6 „	2,2	73,3	270,2	27,1	100 : 103,8
Pen. chrysogenum	23 „	4,1	Началось прорастание			8 „	3,2	12,7	102,3	12,4	—
„ „	23 „	3,4	10,9	86,8	12,5	8 „	2,1	163,3	371,2	43,9	100: 1505,0*

* Продолжительность опыта 48 часов

Таблица 6

Рост Asp. niger и Asp. flavus в газовой смеси, содержащей 1—10% углекислоты

Гриб и скорость продувания в часах	Продолжительность опыта в часах	Питательная среда	pH в начале опыта	Продуваемый воздух: обычный — pH в конце опыта	вес гриба в мг	потребленная глюкоза в мг	экономич. коэффициент	с 1% CO_2 — pH в конце опыта	вес гриба в мг	потребленная глюкоза в мг	экономич. коэффициент	Отношение веса гриба с обычным воздухом к весу с 1% углекислоты. Вес гриба с обычным воздухом принят за 100
Asp. niger,	48	№ 1, 5% сахара	4,3	1,6	198,5	601,0	33,0	1,8	103,5	393,0	26,3	100 : 52,2
6 л 1% CO_2	24	№3, 0,75% глюкозы	6,8	4,8	27,9	91,6	30,4	4,8	21,0	67,6	31,1	100 : 75,9
Asp. flavus	24	То же	6,8	6,65	7,8	31,6	24,6	6,60	8,0	33,2	24,1	100 : 102,5
6 л 1% CO_2	48	„ „	6,8	6,9	69,8	196,1	35,5	6,73	72,1	187,8	38,3	100 : 103,3
Asp. flavus	41	„ „	6,8	7,4	77,0	188,9	40,7	7,0	91,0	226,3	40,2	100 : 118,2
1 л 6% CO_2	41	„ „	4,9	6,2	71,7	213,7	33,2	5,6	55,4	167,6	33,0	100 : 77,9

Примечание: pH повышается при стоянии растворов вследствие выделение CO_2

вредное действие от щелочности среды в большей мере, чем при достаточном снабжении воздухом. В одновременно проводимом опыте при слабокислой реакции (питательная среда в течение опыта подкислялась несколько раз серной кислотой) то же количество угольной кислоты тормозит рост гриба на 22% по сравнению с продуванием обычным воздухом.

Выводы

1. Углекислота, находящаяся в воздухе, стимулирует рост Asp. niger, Asp. flavus, Rh. nigricans и Pen. chrysogenum.
2. Стимулирующее действие углекислоты воздуха ясно проявляется на первых стадиях роста, а именно на набухании и прорастании конидий.
3. Степень стимулирования различна у разных видов грибов. Она наибольшая у Asp. flavus и Pen. chrysogenum и наименьшая у Rh. nigricans.
4. Увеличение углекислоты до 1% в воздухе, продуваемом со скоростью 6 л в час, тормозит рост Asp. niger, а на Asp. flavus не оказывает влияния.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Получено 30 XII 1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аристовская Т. В. Использование CO_2 и возможность редукции карбоксила гетеротрофами. Микробиология, X, 701, 1941.
2. Аристовская Т. В. Значение CO_2 в жизнедеятельности гетеротрофного микроорганизма. Успехи совр. биол., XVII, 54, 1944.
3. Загорянский В. С. Влияние CO_2, на хранение плодов. Тр. Центр. научно-иссл. биохим. ин-та пищевой пром-сти, III, 141, 1933.
4. Журавский Г. И. О газовом обмене Asp. niger при образовании лимонной кислоты. Микробиология, VIII, 414, 1939.
5. Каюкова Н. И. Влияние углекислого газа на развитие плесневых грибов, поражающих масличные семена при их хранении. Тр. Центр. научно-иссл. биохим. ин-та пищевой пром-сти, III, 194, 1933.
6. Лебедев А. Ф. Об ассимиляции углерода сапрофитами. Изв. Донск. гос. ун-та, I, 25, 1921.
7. Никитинский Я. Я. Углекислый газ как консервант при хранении пищевых продуктов. Пищевая пром-сть, № 5, стр. 21, № 6, стр. 28, 1932.
8. Понтович В. Э. О возможности использования углекислоты в синтетических процессах гетеротрофных организмов. Изв. АН, серия биол., 5, 120, 1951.
9. Селибер Г. Л. Углекислота как фактор жизнедеятельности гетеротрофных организмов и тканей. Природа, № 5—6, стр. 85, 1942.
10. Rippel A. u. Hailmann, Untersuchungen über die Wirkung der Kohlensäure auf Heterotrophen. Archiv für Microbiologie, 1, 119, 1930.
11. Steinberg R. A. Influence of carbon dioxide on response of Asp. niger to trace elements. Plant Physiol., 17, 129, 1942.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГНИЛОСТНЫХ, ТИОНОВОКИСЛЫХ, МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ И ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ГРУНТАХ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ

Л. К. Осницкая

Впервые микробным населением Каспийского моря, и именно «серными бактериями, обитающими на поверхности морского дна», заинтересовался Книпович [5] в 1904 г. в связи с вопросом об образовании и исчезновении сероводорода в глубинах Каспия. Однако детальное микробиологическое исследование Каспийского моря было начато позднее — лишь в 30-х годах.

Малиянц [9] в 1933 г. обобщила проведенные ею и другими исследователями [8] работы по микробиологии грунтов средней и южной частей Каспийского моря. Наиболее распространенным и интенсивным процессом, происходящим в грунтах Каспийского моря, по мнению Малиянц, является процесс десульфуризации, вызываемый главным образом Microspira aestuarii. Это дает основание Малиянц считать, что образование сероводорода в Каспийском море в значительной степени происходит за счет деятельности десульфурирующих бактерий. Из всех образцов грунтов были выделены очень активные культуры тионовокислых бактерий (чаще всего Thiobacillus thioparus), а также пурпурные серобактерии, денитрифицирующие (Th. denitrificans), нитрифицирующие (Nitrosomonas), азотфиксирующие (Azotobacter, Radiobacter) и другие микроорганизмы.

Широкое распространение в придонных слоях илов южной части Каспийского моря азотобактера было еще ранее показано Ковалевой [6]. Нерсесян [10] выделил маслянокислых бактерий типа Clostridium pasteurianum из всех исследованных образцов ила Южного Каспия. Следует также упомянуть об исследованиях по Южному и Среднему Каспию Колесник [7] и Рейнфельд [11], которые подтвердили широкое распространение почти всех физиологических групп микроорганизмов в придонных илах.

Изучение грунтов Южного Каспия с целью выяснения вертикального распространения в них сапрофитных бактерий было проведено Дианową и Ворошиловой [2]. Они нашли, что абсолютное число бактерий уменьшается по мере углубления в толщу грунта, по мере удаления от берега и по мере увеличения глубины моря, поэтому стерильный горизонт в прибрежной зоне залегает глубже, чем в удаленном от берега районе, где он как бы передвигается кверху.

Что касается северной части Каспийского моря, то ей уделялось значительно меньше внимания и число работ по микробиологическому изучению Северного Каспия исчерпывается двумя работами: Буткевича [1] и Евдокимова [3]. Евдокимов в образцах илов, взятых со дна залива Кайдак, нашел весьма разнообразную микрофлору — десульфурирующие, гнилостные, нитрифицирующие микроорганизмы. Содержание бактерий в 1 г ила, определенное по методу Виноградского, колебалось от 105,7 млн. до 1627 млн.

Буткевич [2] совместно со своими сотрудниками Дианową и Ворошиловой в 1935 г. в районе о-ва Долгого обнаружил, что поверхность илистых отложений затянута бактериальной слизистой пленкой, толщина

которой иногда достигала нескольких миллиметров. При нарушении такой пленки наблюдалось выделение из грунта сероводорода и других газов. Анализ выделяющихся из грунтов газов показал, что они состоят из сероводорода, азота, углекислоты, водорода и довольно значительных количеств метана (до 60%), образующихся в результате протекающих в грунтах процессов разложения органических веществ. Однако, несмотря на обильное содержание в илах сероводорода, проникновения его в слои воды не наблюдалось до тех пор, пока не разрывалась пленка, которая, очевидно, играла роль барьера, задерживающего проникновение сероводорода и других газов из ила в водную толщу. Микроскопическое обследование пленок показало наличие в них серобактерий, способных окислять сероводород, деятельностью которых можно объяснять отсутствие сероводорода в воде. Наряду с серобактериями в пленке были обнаружены микроорганизмы нитрифицирующие, окисляющие аммиак, метан и водород. Аналогичные пленки, состоящие из такого же комплекса микроорганизмов, были найдены в заливах Мертвый Култук и Кайдак.

Буткевич предполагает, что образование бактериальных пленок на илах, типа баткаков, представляет общее явление для мелководных районов Каспийского моря. Отсутствие такого бактериального барьера может создать в воде условия, при которых существование каких-либо животных организмов будет невозможно.

Наряду с этим бактериальные пленки, по мнению Буткевича, могут играть роль пищевого материала для животных организмов. Кроме того, продукты распада органических веществ — углекислота, метан, водород, аммиак — при помощи микроорганизмов превращаются в сложные органические вещества и тем самым вновь включаются в пищевую цепь.

Зенкевич [4], цитируя работу Буткевича, соглашается с его мнением о роли бактериальной пленки как естественного барьера, препятствующего проникновению из грунтов ядовитых газов, и полагает, что «если бы эта бактериальная пленка, окисляющая сероводород, метан и водород, исчезла, то «воды Каспия лишились бы всякой жизни» (стр. 450—451).

Задачей наших исследований было выяснить, какова в настоящее время протяженность на дне Северного Каспия бактериальной пленки, а также получить представление о количественном соотношении в ней физиологических групп микроорганизмов, окисляющих сероводород, метан и водород.

Для сбора материала и первичной обработки его были проведены экспедиции в 1951 и 1952 гг. в северную часть Каспийского моря.

В июле 1951 г. нами была обследована вся прибрежная мелководная часть Северного Каспия, начиная от о-ва Тюлений на юго-западе, вдоль северного и восточного побережья к п-ову Бузачи до о-ва Долгий и затем о-ва Кулалы.

На 83 станциях (рис. 1) взяты дночерпателем образцы грунтов. Особенно тщательные поиски пленки были проведены в районе о-ва Долгий, где пленка наблюдалась в 1935 г. Буткевичем. В этом районе было отобрано 11 образцов грунтов в разной удаленности от берега. Нигде на всем протяжении обследованной части прибрежной зоны Северного Каспия, несмотря на тщательные обследования, бактериальная пленка, видимая невооруженным глазом, не была обнаружена, исключая станции 1825 и 1828, где на грунте были найдены какие-то серо-зеленые образования, напоминающие пленку.

Нашей задачей было также получить представление о количественном распределении свободно живущих в грунтах Северного Каспия гнилостных микроорганизмов для выяснения интенсивности развивающихся в грунтах процессов разложения органических веществ с образованием вредных продуктов; тионовокислых микроорганизмов — для выяснения интенсивности процессов окисления сероводорода и тиосоединений, а

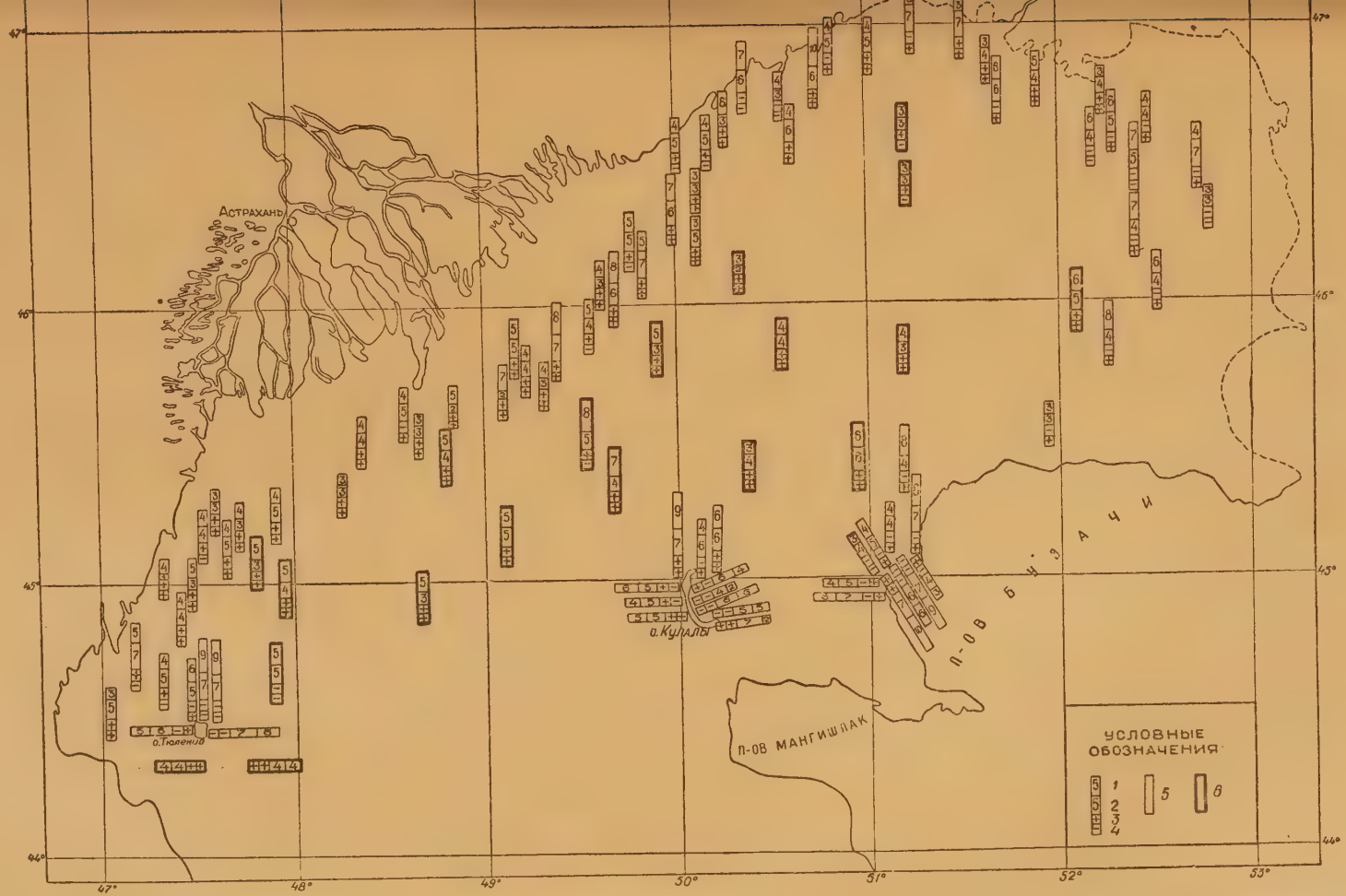


Рис. 1. Распространение гнилостных, тионовокислых, метанокисляющих и водородокисляющих микроорганизмов в поверхностных слоях грунтов Северного Каспия.

Условные обозначения. Титр бактерий в 1 г грунта. *1* — 10^3 гнилостных; *2* — 10^3 тионовокислых; *3* — развитие метановых; *4* — развитие водородных; *5* — 10^{16} 1951 г.; *6* — 10^{16} 1952 г.

также распространения и активности в грунтах Северного Каспия окисляющих метан и окисляющих водород бактерий.

Методика работы была следующая. Полученные со дна образцы грунтов отбирались в стерильные пробирки и трубки. Определенная навеска ила (большей частью 0,5 г) разводилась в стерильной воде в разведении 1 : 10 и из этой суспензии делались возрастающие кратно 10 разведения, которые высевались на МПБ и на среду Натансона в количестве 0,5 мл.

На среду Зёнгена для метановых бактерий и на среду Омелянского для водородных бактерий засевалось по 1 мл разведения 1 : 10. Посевы на МПБ и среду Натансона производились на судне, сразу же после отбора образцов. Культуры выдерживались при температуре 26—30°. О развитии гнилостных микроорганизмов судили по появлению через пять дней в бульоне мути и пленки. После этого срока производилась реакция на сероводород (с 1%-ным уксуснокислым свинцом). Наблюдения за ростом тионовокислых микроорганизмов на среде Натансона и реакция на сульфаты (с 5%-ным хлористым барием) производились через 10—12 дней, затем повторно через месяц и через два месяца. Посевы грунтов на среды для метановых и водородных бактерий в связи с техническими трудностями постановки опытов были сделаны в Москве. Стерильная среда для водородных и метановых бактерий разливалась по 2 мл в стерильные стаканчики с крышками (емкостью 5 мл) и заражалась грунтом. Стаканчики помещались под стеклянный колпак, плотно притирающийся к металлической платформе с краном для откачивания воздуха. Из-под колпака выкачивался воздух и затем вводилась газовая смесь требуемого состава. Посевы выдерживались при 27° в течение месяца, после чего производился просмотр их.

Отобранные 83 образца грунтов можно было по внешнему виду приближенно разделить следующим образом:

1) пылеватый песок с ракушей — 40 образцов;
2) илистый песок с ракушей — 18 образцов;
3) песчанистый ил с ракушей — 5 образцов;
4) илистый песок с ракушей с запахом H_2S — 14 образцов, отобранных главным образом в районе п-ова Бузачи, где наблюдался вязкий проваливающийся грунт с выходом газа пузырьками при продавливании верхнего слоя грунта;
5) травянисто-глинистый ил — 4 образца;
6) черный ил с запахом H_2S — 1 образец;
7) ракуша красная — 1 образец.

Полученные данные по количественному распространению гнилостных и тионовокислых микроорганизмов и по распространению и активности окисляющих метан и окисляющих водород микроорганизмов представлены на рис. 1, где для каждой отдельной станции показано максимальное разведение, в котором найдены гнилостные и тионовокислые бактерии и установлено наличие метановых и водородных бактерий.

На рис. 1 видно, что как гнилостные, так и тионовокислые, метановые и водородные бактерии широко распространены по всему охваченному нашими исследованиями району Северного Каспия вне зависимости от глубины взятия образца и места станции.

Более детальный анализ полученных данных по каждому типу грунта изображен на рис. 2, где графически показана частота встречаемости в образцах того или иного грунта гнилостных, тионовокислых, метан- и водородокисляющих бактерий.

Как видно из рис. 2а, во всех образцах пылеватого песка с ракушей (40 образцов) были обнаружены все исследованные четыре группы микроорганизмов. Более чем в 60% исследованных образцов содержались водород- и метанокисляющие бактерии. В 50% образцов содержание гнилостных микроорганизмов достигало титра 10^4 на 1 г. Концентрации, бо́льшие, чем 10^6, были найдены всего лишь на 7,5% образцов. В 55% образцов содержалось тионовокислых бактерий от 10 000 до 100 000 на 1 г. В 15% образцов было 10 млн. тионовокислых бактерий на 1 г.

В илистом песке с ракушей (рис. 2б) водородные бактерии обнаружены в 60% образцов, метановые — в 50%. Содержание гнилостных бактерий для большинства образцов (83%) было в пределах титров $10^3 — 10^7$, в трех образцах (17%) концентрация гнилостных бактерий была очень высока — 10^8, 10^9 и 10^{10} в 1 г. В 25% образцов количество тионовокислых бактерий равнялось 100 000 на 1 г и в 10% образцов количество тионовокислых микроорганизмов достигало 10 млн. клеток на 1 г.

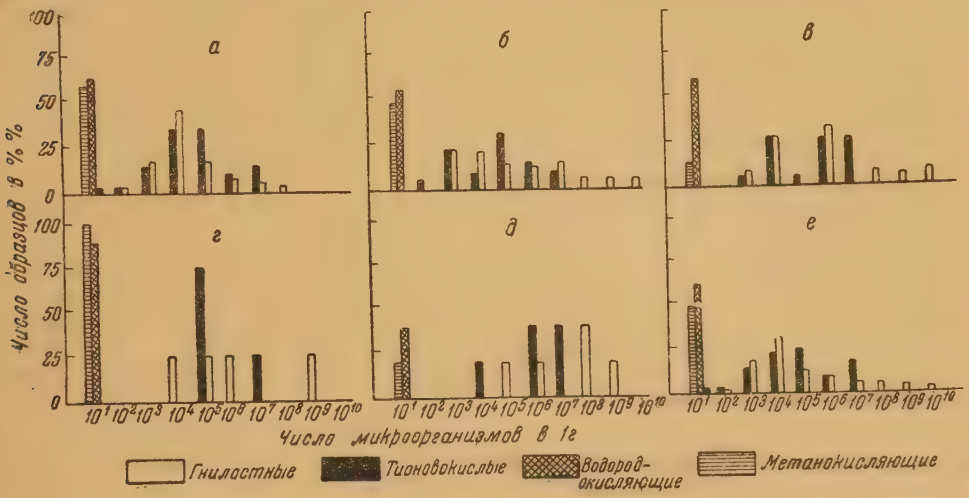


Рис. 2. Распространение гнилостных, тионовокислых, метанокисляющих и водородокисляющих микроорганизмов в различных грунтах Северного Каспия (мелководная часть, 1951 г.)

а — пылеватый песок с ракушей: *б* — илистый песок с ракушей; *в* — илистый песок с ракушей и запахом H_2S; *г* — травянисто-глинистый ил; д — песчанистый ил с ракушей; *е* — суммированные данные

В илистом песке с ракушей с запахом H_2S (рис. 2в) метановые бактерии обнаружены всего лишь в 14% образцов, в то время как водородные бактерии — в 64%. Количество гнилостных бактерий для большинства (65%) образцов достигало $10^4 — 10^6$, а количества 10^8, 10^9 и 10^{10} на 1 г обнаружены лишь в единичных образцах. Что касается тионовокислых микроорганизмов, то их концентрация в разных образцах находилась в пределах от 10^4 до 10^7 на 1 г.

На рис. 2г представлены данные для так называемого травянистоглинистого грунта, обнаруженного нами около о-ва Кулалы. Метановые и водородные бактерии присутствовали почти во всех образцах этого грунта (100% для метановых и 75% для водородных), количество тионовокислых микроорганизмов очень большое — 10 млн. на 1 г (25% образцов) и 100 000 на 1 г (в 75% образцов). Гнилостные бактерии содержатся в концентрации $10^4 — 10^3$.

В песчанистом иле с ракушей (рис. 2д) тионовокислые бактерии представлены очень обильно — в 68,0% образцов. Количество их равнялось $10^6—10^7$ на 1 г. Содержание гнилостных микробов в 40% образцов достигало 10^8 на 1 г. Водородные бактерии чаще встречались, чем метанокисляющие. В образце красной ракуши не были найдены метанокисляющие и водородокисляющие бактерии, а тионовокислые и гнилостные микробы дали развитие в разведениях 1 : 10 000 и 1 : 000 000. Образец черного ила с запахом сероводорода содержал как метанокисляющие, так и водородокисляющие бактерии, а количество тионовокислых и гнилостных микроорганизмов равнялось одной тысяче на 1 г.

На рис. 2е изображены суммированные данные для всех исследованных грунтов.

Из рисунков видно, что метанокисляющие бактерии найдены в 50% образцов, водородокисляющие — в 62%. Тионовокислые бактерии в большинстве образцов (80%) содержались в количествах 10^4 — 10^7 на 1 г. Гнилостные микроорганизмы, хотя в единичных образцах (13%) и встречаются в количествах 10^8 — 10^{10}, но в большей части образцов (80%) содержались в количествах 10^3 — 10^6 в 1 г.

На основании приведенных данных можно сделать следующие выводы:

1. Гнилостные бактерии представлены почти одинаково во всех грунтах; несколько меньше их было найдено в образцах пылеватого песка с ракушей и незначительно бо́льшие количества — в других грунтах, например в песчанистом иле с ракушей (средний титр 10^7), не считая, конечно, образцов красной ракуши и черного ила, которых было отобрано всего по одному, и полученные по ним данные поэтому могут быть непоказательными.

2. Тионовокислые бактерии равномерно (за исключением образцов красной ракуши и черного ила) представлены во всех грунтах, в основном в пределах средних титров 10^4 — 10^5 на 1 г.

3. Окисляющие метан и водород бактерии преимущественно содержались в травянисто-глинистом иле и в пылеватом песке с ракушей, в то время как в песчанистом иле с ракушей и илистом песке с запахом H_2S — не из всех исследованных образцов были выделены культуры водород- и метанокисляющих бактерий — факт, объяснения которому мы пока еще не нашли.

Таким образом, проведенное изучение грунтов мелководных районов Северного Каспия позволило сделать ряд интересных выводов в отношении обитания в этих грунтах микроорганизмов четырех физиологических групп. Однако представлялось необходимым расширить эти исследования, распространив их на глубоководную часть Северного Каспия, что и было сделано в экспедиции 1952 г., проведенной также в июле. Принимая во внимание сравнительно медленное изменение характера грунтов во времени, следовало полагать, что и микробиологическое население грунтов не претерпело за год больших изменений, а, следовательно, результаты исследований 1951 и 1952 гг. будут вполне сравнимыми.

Методика отбора образцов грунта, первичной экспериментальной обработки их на судне и последующих лабораторных исследований была сохранена та же, что и в 1951 г. Всего было собрано и затем изучено 19 образцов различных грунтов на станциях, равномерно распределенных по глубинной части Северного Каспия (см. рис. 1), начиная с запада от о-ва Тюлений и кончая уральской бороздиной на востоке.

По внешнему виду отобранные образцы разделялись следующим образом:

1) пылеватый песок с ракушей — 6 образцов;
2) илистый песок с ракушей — 1 образец;
3) песчанистый ил с ракушей — 4 образца;
4) ил серый — 5 образцов;
5) ил черно-серый с запахом H_2S — 2 образца;
6) ракуша желто-красная — 1 образец.

Результаты обработки этих образцов представлены на рис. 1.

Ни в одном из полученных образцов не было обнаружено ничего напоминающего бактериальную пленку. Но в то же время в каждом образце были найдены в значительных количествах гнилостные, тионовокислые, метанокисляющие и водородокисляющие бактерии. Ни глубина взятия пробы, ни место станции не оказывали заметного влияния на содержание исследованных групп микроорганизмов. Что касается распределения бактерий в зависимости от характера грунта, то, судя по рис. 3, можно сказать следующее.

В пылеватом песке с ракушей (рис. 3а) число гнилостных бактерий

10^5 на 1 г встречается в 50% образцов, а 10^7 и 10^8 найдены в 33% образцов. 83% образцов содержали от 10^3 до 10^5 тионовокислых бактерий в 1 г. Метановые и водородные бактерии были найдены в 83% образцов.

Во всех пяти исследованных образцах серого ила (рис. 3б) были найдены метан- и водородокисляющие бактерии. В 60% образцов было 10^4 тионовокислых и столько же гнилостных бактерий в 40% остальных образцов тионовокислых бактерий было 10^3, а гнилостных — 10^5.

В песчанистом иле (рис. 3г) также во всех образцах были найдены метановые и водородные бактерии, а большая часть образцов (50%) содержала 10^4 тионовокислых и 10^5 гнилостных бактерий на 1 г.

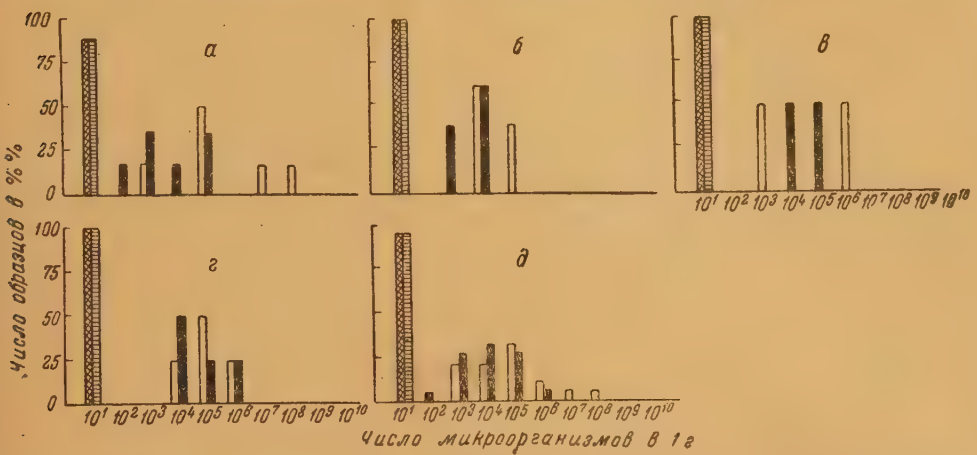


Рис. 3. Распространение гнилостных, тионовокислых, метанокисляющих и водородокисляющих микроорганизмов в различных грунтах глубинной части Северного Каспия (1952 г.)

а — пылеватый песок с ракушей; *б* — ил серый; *в* — ил серый или черный с запахом H_2S; *г* — песчанистый ил; *д* —суммированные данные

В черно-сером иле с запахом H_2S (рис. 3в) количества гнилостных бактерий были 10^3 и 10^6, а тионовокислых — 10^4 и 10^5. В обоих образцах были найдены и метан- и водородокисляющие бактерии.

Как в образце илистого песка, так и в ракуше желто-красной содержание тионовокислых и гнилостных микроорганизмов равнялось 1000 бактерий в 1 г, и в обоих образцах были найдены метановые и водородные бактерии.

Как видно из рис. 3д, изображающего суммированные данные по всем грунтам глубоководной части Северного Каспия, в 80% образцов, или в 15 из 19, содержалось 10^3 — 10^5 гнилостных бактерий, в 10% — 10^6, а титры 10^7 и 10^8 были обнаружены лишь в одном образце (5%) каждый.

Тионовокислые бактерии в количестве 10^3 — 10^5 были в 90% образцов (17 образцов из 19), в остальных 10% было сто и миллион бактерий в 1 г. В 95% образцов были найдены метанокисляющие и водородокисляющие микроорганизмы.

На основании полученных данных трудно сказать, какой тип грунта более благоприятен для развития той или иной группы микроорганизмов. Действительно, из рис. 3 мы видим следующее.

1. Метанокисляющие и водородокисляющие бактерии найдены во всех образцах грунтов за исключением 17% образцов пылеватого песка с ракушей, где не было обнаружено этих бактерий.

2. Гнилостные бактерии развиваются во всех грунтах в основном в количествах 10^3 — 10^5 на 1 г. Бóльшие концентрации — 10^7 — 10^8 — найдены лишь в двух образцах пылеватого песка с ракушей.

3. У тионовокислых бактерий также не обнаружено предпочтения к какому-либо грунту: в большинстве (11 из 19) образцов грунта их найдено от 10 до 100 000 на 1 г. В шести образцах содержание тионовокислых равнялось 1000 на 1 г.

4. Представленные средние титры гнилостных и тионовокислых бактерий по разным грунтам глубоководной части Северного Каспия, подобно тому, как это имело место для мелководной части, практически равны между собой.

Что касается морфологии ведущих форм, то микроскопирование показало, что на среде Натансона наиболее часто встречаются: 1) мелкие тонкие палочки; 2) короткие толстые округлые палочки; 3) мелкие палочки с включениями; 4) очень мелкие кокки. Однако нельзя сказать, какая именно из этих форм вызывает образование сульфатов. Более однородная картина получилась при микроскопировании метанокисляющих и водородокисляющих культур, где основной формой были короткие округлые палочки.

Сравнение таблиц по данным экспедиций 1951 и 1952 гг. показывает, что между грунтами, относящимися к одному типу, но собранными в разные годы, по характеру микрофлоры нет различий.

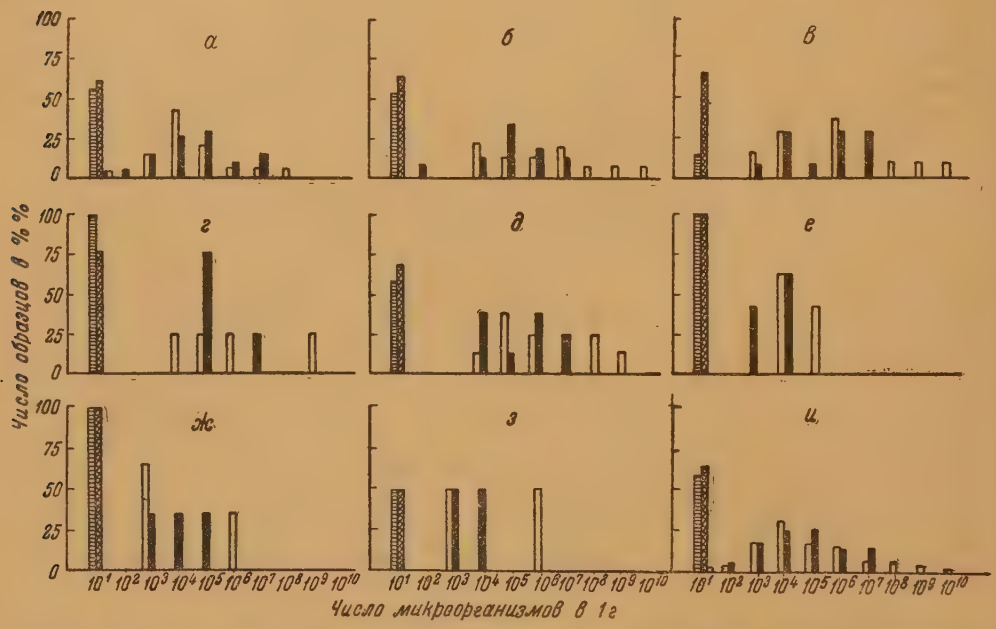


Рис. 4. Распространение гнилостных, тионовокислых, метанокисляющих и водородокисляющих микроорганизмов в различных грунтах Северного Каспия (1951 — 1952 гг.

а — пылеватый песок с ракушей; *б* — илистый песок; *в* — илистый песок с ракушей и запахом H_2S; *г* — травянисто-глинистый грунт; *д* — песчанистый ил; *е* — ил серый; *ж* — ил серый или черный с запахом H_2S; *з* — ракуша желто-красная; *и* — суммированные данные

Суммированные данные для двух экспедиций по разным типам грунтов (рис. 4) позволяют сделать ряд общих выводов по всему Северному Каспию.

Выводы

1. В обследованных нами районах Северного Каспия бактериальная пленка, обнаруженная ранее Буткевичем, не была найдена.

2. В грунтах Северного Каспия широко распространены гнилостные, тионовокислые, метанокисляющие и водородокисляющие микроорганизмы вне зависимости от глубины моря и места станции.

3. Метанокисляющие и водородокисляющие бактерии представлены во всех образцах грунтов, первые — в 60%, вторые в 70% всех образцов, за исключением илистого песка с ракушей с запахом сероводорода, где метановые бактерии были найдены лишь в 2 из 14 образцов (14%), и одного образца ракуши красной, в которых метановые и водородные бактерии не были найдены.

4. Тионовокислые бактерии были обнаружены во всех образцах грунтов, причем лишь единичные образцы (1—3% от общего числа проб) дали развитие тионовокислых при посевах малых разведений. Бóльшая часть образцов (64%) содержала от 10^4 до 10^6 клеток тионовокислых бактерий в 1 г.

5. Во всех образцах грунтов присутствовали также и гнилостные бактерии большей частью в концентрациях $10^4 — 10^5$ на 1 г (49% от общего числа, или 50 образцов);

6. Хотя бактериальная пленка не была найдена, но обнаруженное нами почти повсеместное присутствие в поверхностных слоях грунта тионовокислых, метанокисляющих и водородокисляющих бактерий дает основание предполагать, что этот активный слой грунта окисляет образующиеся в результате разложения органических остатков сероводород, метан и водород, предохраняя тем самым водную толщу от проникновения в нее ядовитых газов и являясь, таким образом, тем естественным предохранительным барьером, которым Буткевич называл бактериальную пленку.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Получено 12.XII.1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буткевич В. С. О бактериальном населении Каспийского и Азовского морей. Микробиология, VII, 1005, 1938.
2. Дианова Е. В. и Ворошилова А. А. Бактериальный профиль морских и озерных осадков, как показатель их эрозии и возраста. ДАН СССР, XXX, № 3, стр. 274, 1941.
3. Евдокимов Д. И. К микробиологическому исследованию заливов Комсомолец (Мертвый Култук) и Кайдак. Комиссия по комплексному изучению Каспийского моря (КАСП) и Совет по изучению производительных сил (СОПС). Тр. по комплексному изучению Каспийского моря. Тр. КАСП, вып. 1, ч. 1, стр. 213, 1937.
4. Зенкевич Л. А. Фауна и биологическая продуктивность моря. Советская наука, стр. 450, 1947.
5. Книпович Н. М. Очерк работ Каспийской экспедиции. 1904.
6. Ковалева Л. И. Азотобактер в иле Каспийского моря. Изв. Азерб. гос. ун-та, 9, стр. 24, 1930.
7. Колесник Е. А. Микробиологическое исследование грунтов южной и средней части Каспийского моря. Комиссия по комплексному изучению Каспийского моря. Материалы по гидробиологии и литологии Каспийского моря, вып. 5, Изд. 1938.
8. Малиянц А. А. и Ланге-Поздеева И. П. Биохимические процессы, вызываемые бактериями на дне Каспийского моря. Изв. Азерб. гос. ун-та, 7, стр. 63, 1928, Баку.
9. Малиянц А. А. Микробиологическое исследование грунта Каспийского моря. Тр. Азерб. нефт. иссл. ин-та (АЗНИИ), вып. XVIII, Геологический отдел, стр. 1, 1933.
10. Нерсесян А. Анаэробные азотусваивающие бактерии Каспийского моря. Изв. Азерб. гос. ун-та, 9, 39, 1930.
11. Рейнфельд Э. А. Микробиологическое исследование донных отложений заливов Комсомолец (Мертвый Култук) и Кайдак и Среднего Каспия. Комиссия по комплексному изучению Каспийского моря. Материалы по гидробиологии и литологии Каспийского моря, вып. 5, Изд. АН СССР, 1938.

О РАСПРОСТРАНЕНИИ АЗОТОБАКТЕРА В ПОЧВАХ

Е. Н. Мишустин

Методические подходы к обнаружению азотобактера

Вопрос о распространении азотобактера в почвах интересует советских исследователей уже давно. Первые попытки сделать известные обобщения по данному вопросу принадлежат Омелянскому [5]. Позднее значительную работу в этом направлении провели многие наши микробиологи, в том числе Сушкина [8]. Не отрицая определенного значения последней работы, я тем не менее был вынужден взять под сомнение ряд основных выводов, сделанных Сушкиной, что нашло свое отражение в моей рецензии [4].

Мои соображения, высказанные в общей форме, были сочтены Сушкиной необоснованными [9], почему я считаю необходимым опубликовать некоторый фактический материал, подтверждающий мою точку зрения. Более обстоятельно вопрос о закономерностях эколого-географического распространения азотобактера мной будет разобран в особой работе, публикуемой в «Трудах Института микробиологии АН СССР».

Прежде всего остановимся на методике исследования. При изучении экологии и экологической географии почвенных бактерий особое внимание следует уделять методическим вопросам. В основном это относится к выбору метода исследования и срокам взятия пробы. Первый момент определяет точность анализа, второй — достоверность делаемых обобщений. Нередко микробиологи считают возможным судить о наличии или отсутствии интересующего их микроба в почве на основании единичных анализов, забывая о существовании определенного ритма его развития и о возможности почти полного вымирания в определенные моменты вегетационного периода. Только что отмеченные упущения приводят к явно ошибочным заключениям, что без труда может быть показано на примере монографии Сушкиной.

Для обнаружения азотобактера в почвах могут быть использованы разные методические приемы. Часто с этой целью применяют метод раскладывания комочков на элективной питательной среде (метод Виноградского). Предполагается, что если в комочке почвы, положенном на среду, имеются зародыши азотобактера, то они прорастут и образуют специфическую колонию. В дальнейшем этот прием мы будем называть «методом комочков».

Заслуживает внимания и другой прием, рекомендованный также Виноградским. Он состоит в изготовлении из исследуемой почвы, к которой прибавляются некоторые питательные вещества, пасты. Последняя вмазывается в небольшие чашки Петри ($d = 5$ см) на слой промытого угля, соединенного стеклянной трубочкой с воздухом. На хорошо аэрируемой почвенной пластинке довольно быстро развиваются колонии азотобактера, подсчет которых дает представление об относительном богатстве изучаемой почвы интересующим нас микробом.

Далее этот прием исследования будет называться «методом пластин». Имеются и другие методы обнаружения азотобактера в почве, но они реже применяются, и здесь мы их разбирать не будем.

Сушкина считает оба метода равнозначными и свои исследования

проводила, пользуясь методом комочков. Между тем нередко на твердой питательной среде азотобактер не прорастает.

В материалах, накопленных мной и моими товарищами по работе, с убедительностью показано, что часто отрицательные данные, полученные при обнаружении азотобактера по методу комочков, не указывают на отсутствие этого микроба в почве, так как на почвенных пластинах, приготовленных из соответствующих же почв, вырастает значительное число колоний азотобактера. Метод комочков менее чувствителен. Обычно, если на почвенной пластине имеется менее 100 колоний азотобактера, то метод комочков дает нулевые показатели. Чем это можно объяснить? Ранее я склонен был думать, что в ряде случаев слабое развитие азотобактера на элективной питательной среде зависит от понижения его азотоусвояющей энергии. Однако со временем я убедился в том, что в значительной мере отмеченное явление определяется антагонизмом бактерий, имеющим место на твердой питательной среде. В почвах содержится большое число олигонитрофильных бактерий. В том случае, когда почва не столь богата клетками азотобактера, олигонитрофилы на питательной среде угнетают его клетки и не дают им развиваться в колонии. Поэтому метод комочков оказывается мало чувствительным и дает сильно преуменьшенные, а подчас и ошибочные показатели. Лишь при анализе почв, очень богатых азотобактером как метод комочков, так и метод пластин обеспечивают хорошее развитие азотобактера.

Я считаю, что при изучении экологии азотобактера необходимо одновременно использовать оба разобранных нами приема. Подобная потребность вытекает из того, что в некоторых, правда редких, случаях азотобактер плохо растет на почвенных пластинах.

В табл. 1 я привожу выборочные данные из записей своих работ и сотрудников лаборатории почвенной микробиологии Института микробиологии АН СССР. Они вполне подтверждают сделанные выше заключения.

Таблица 1

Установление наличия азотобактера в почках различными методами

Почва	Культура	Дата	Число колоний на почвенной пластине	% комочков почвы, давших колонии азотобактера
Дерново-подзолистая почва, С.-х. акад. им. Тимирязева	Рожь (по РК)	9. V	25	0
	Рожь (по навозу)	9. VII	410	0
		9. V	10	0
		9. VIII	4	0
Обычный чернозем Каменной степи	Травосмесь	10. IV	116	2
	Яровая пшеница	8. VI	93	8
	Полив дождеванием	21. VII	70	0
	Травосмесь, полив дождеванием	8. VI	50	0
		8. VII	31	0
Светлокаштановая почва, Ергени	Целина	20. VI	135	5
		30. VII	123	0
		4. IX	46	0
Серозем, Кура-Араксинская низменность	Невозделываемая засоленная почва	22. VI	140	0
	То же (другая делянка)	22. VI	100	0
	Степь полынно-мятликовая	22. VI	13	0

Таким образом, приведенные данные определенно говорят о том, что основываться только на методе комочков при изучении экологии азотобактера нельзя. В ряде случаев это приводит к существенной ошибке.

Почвенные пластины чаще дают положительный результат, во-первых, возможно в силу лучшего развития на них азотобактера, а во-вторых, в силу того, что для их изготовления берется бо́льшая масса почвы и тем облегчается выявление этой бактерии.

О необходимости сезонных наблюдений при изучении экологии азотобактера

При установлении закономерностей распространения в природе бактерий следует иметь в виду возможность их сезонного развития в почве. Периодами они могут бурно развиваться, в некоторое же время практически исчезать или оставаться в почвенном слое в количествах, не уловимых обычными методами анализов. Совершенно очевидно, что однократный анализ почвы не может дать представления об экологии неспороносного микроба, в том числе и азотобактера.

Сушкина всю свою экспериментальную работу, вошедшую в монографию, строит на единичных анализах, не указывая даже на время взятия проб. Подобный подход обосновывается данными Омелянского [6], показывающими длительную сохраняемость высушенных чистых культур азотобактера. Отвечая на мои критические замечания, Сушкина пишет, что проф. Мишустин, очевидно, забывает об этом обстоятельстве. Однако при подобного рода заключениях упускается из вида, что в чистых культурах имеется астрономическое число клеток азотобактера и пересеваемость может зависеть от выживания лишь отдельных его клеток. Почвенным микробиологам хорошо известно, что при неблагоприятных условиях в почвах азотобактер довольно быстро вымирает. В частности, это заставляет весьма ограничивать гарантийный срок действия препарата «азотоген».

Впрочем, сама же Сушкина [7] в одной из ранее опубликованных работ полностью разделяет мои установки. Здесь мы читаем: «Что касается мнения некоторых авторов о большой устойчивости азотобактера к высушиванию, то этот взгляд основан, во-первых, на наблюдениях над чистыми культурами микроба в пробирках и поэтому вряд ли может быть без оговорок переноситься на почву. Кроме того, и это нам представляется главным, делая выводы о влиянии высушивания на развитие азотобактера, всегда забывают о количественной стороне вопроса, которая, конечно, в таких случаях имеет решающее значение».

Более чем странное несовпадение высказываний Сушкиной по одному и тому же вопросу в разных работах может быть объяснено лишь попыткой опорочить справедливые замечания рецензента.

Высказывая правильные мысли о роли сезонных наблюдений и роли цифровых показателей, Сушкина отходит от них в своей монографии. Между прочим наличие азотобактера обозначается крестами, а не цифрами. Это объясняется тем, что применение цифр, по мнению Сушкиной, «...требует большого внимания и напряженности при просмотре полученных данных...» [8, стр. 81]. На самом же деле здесь идет речь о величинах, не превышающих нескольких сотен (!).

Для подтверждения высказанных мной соображений о необходимости сезонных наблюдений рассмотрим пример, взятый из материалов нашей сотрудницы Петровой, работавшей в 1950 г. в Каменной степи (табл. 2).

Из данных табл. 2 следует, что, если исследовать почву Каменной степи методом комочков (особенно летом), то следует сделать заключение об отсутствии в ней азотобактера. К такому выводу и приходит Сушкина. Между тем метод почвенных пластин открывает весной здесь наличие значительного числа клеток активного азотобактера. В течение вегетационного периода, по мере иссушения почвы, число зародышей азотобактера значительно уменьшается. Таким образом, азотобактер появляется в черноземах как весенний эфемер. Отсюда следует вывод, что

Таблица 2

Наличие азотобактера в черноземных почвах Института земледелия

(Центральная черноземная область, Каменная степь)

Почва	Метод	10. IV	30. V	27. VI	27. VII	17. VIII	20. IX
Некосимая степь	Пластин	190	4	6	0	0	0
Яровая пшеница по пласту	(число колоний) .	120	30	40	8	3	0
Некосимая степь	Комочков	3	0	0	0	0	0
Яровая пшеница по пласту	(% проросших комочков)	2	0	0	0	0	0

Примечание. Для анализа взят слой почвы 0—10 см.

представления об экологии азотобактера могут дать лишь сезонные наблюдения.

Азотобактер, выделенный с почвенных пластин, оказывается вполне жизнеспособным и энергично фиксирует газообразный азот.

Приведем другой пример. На Деркульской опытной станции Института леса Академии наук СССР (Ворошиловградская обл.) в течение летнего сезона 1951 г. Е. В. Руновым был сделан ряд наблюдений над состоянием азотобактера в черноземах. Приводимые ниже данные (табл. 3) были получены по методу комочков.

Таблица 3

Динамика развития азотобактера в черноземных почвах Деркульской опытной станции

(% комочков почвы, давших колонии азотобактера)

Почва	Слой	25. IV	5. VII	9. VIII
Целинная степь	0—10	100	0	0
	10—20	100	0	0
	20—30	100	0	0
Окультуренная почва между полосами	0—10	45	0	0
	10—20	0	0	0
	20—30	0	0	0

На последнем примере с большой очевидностью вырисовывается факт весеннего развития азотобактера на недостаточно увлажненных в летний период черноземах. Следов какого-либо «губительного» действия на азотобактер растительности целинной степи мы также не отмечаем.

Все изложенное относительно целинных и неорошаемых черноземов позволяет сделать вывод, что Сушкина имеет ошибочное представление о развитии в них азотобактера.

Дадим пример, относящийся к светлокаштановым почвам (Аршань-Зельмень Сталинградской области). Соответствующие материалы, полученные в 1951 г. сотрудницей нашей лаборатории Кудриной, приведены в табл. 4.

Весной азотобактер без всякого труда выявляется как в окультуренной, так и в целинной каштановой почве обоими исследованными методами. С наступлением более сухой погоды метод комочков перестает обнаруживать азотобактер. На почвенных пластинах этот микроб продолжает попрежнему хорошо выявляться. По остающимся, пока невыяс-

Таблица 4

Наличие азотобактера в светлокаштановых почвах Аршань-Зельменя

Почва	Горизонт	Число колоний азотобактера при учете методом почвенных пластин				% обрастаний комочков почвы азотобактером			
		17. IV	20. VI	30. VII	1. IX	17. IV	20. VI	30. VII	1. IX
Целина	A_0—A_1	108	95	42	46	35	0	0	0
	B_1	127	30	23	82	10	0	0	0
	B_2	18	10	50	37	0	0	0	0
Пашня	A_1	135	135	123	30	45	5	0	0
	B_1	116	178	148	17	20	15	0	0
	B_2	27	117	140	42	0	0	0	0

ненным для нас причинам, в каштановых почвах во время дефицита влажности азотобактер лучше сохраняется, чем в черноземах. Только что разобранный пример, как и последующий, доказывает недопустимость заключений о наличии или отсутствии азотобактера на основании однократного анализа, особенно производимого методом комочков. В общем «губительный» для азотобактера режим в каштановых почвах мы также установить не могли. Все полученные данные говорят против взглядов, развиваемых Сушкиной.

Аналогичные примеры о развитии азотобактера лишь в короткие отрезки времени года мы могли бы привести и для других почв.

Факторы, обеспечивающие развитие азотобактера в почве

Как известно, азотобактер весьма требователен к наличию в почве калия и фосфора. Он плохо переносит кислую реакцию среды. Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали значительную влаголюбивость этой бактерии. Из наших данных следует, что, например, в черноземе Каменной степи азотобактер начинает развиваться лишь при влажности почвы около 25%. Полная влагоемкость данной почвы равна 63%, капиллярная 52%, а влажность завядания 15,6%.

Совершенно очевидно, что в тех местах, где даже имеется благоприятный почвенный фон для развития азотобактера, влага может ограничивать его размножение.

Интересные наблюдения над развитием азотобактера в черноземных почвах были сделаны Геллером и Харитоном [1]. Данные исследователи установили, что в почвах травопольного севооборота азотобактера тем больше, чем ближе находится поле к пласту. Здесь резко выявляется роль доступного органического вещества. Отмеченные наблюдения вполне подтверждаются данными, накопленными в нашей лаборатории.

На роль органического вещества почвы в жизнедеятельности азотобактера обращала внимание Кононова [2].

Относительное значение воды и органических веществ для развития азотобактера в почвах Каменной степи было проведено в следующем опыте, проведенном в нашей лаборатории Петровой. Соответствующие почвы доводились до влажности в 60% от полной влагоемкости и ставились в термостат на 25°. Таким образом, делалась попытка активировать размножение имевшихся в почве зародышей азотобактера за счет органических соединений, находящихся в почве. Через одну и две недели после закладки опыта в ней учитывался азотобактер методом пластин. Результаты второго учета представлены в табл. 5.

Как видно, весной 1951 г. азотобактер в исходной почве развился слабо. Компостирование почвы в тепле привело к размножению его клеток лишь в почвах, обеспеченных органическим веществом (вышедших из-под пласта и по обороту пласта). Это показывает, что в почвах раз-

Таблица 5

Активация азотобактера в почвах Каменной степи

Почва	Анализ до активации				Анализ после активации			
	дата взятия проб с поля							
	12. IV	15. VI	6. VII	29. VII	12. IV	15. VI	6. VII	19. VIII
Число колоний азотобактера на почвенную пластину								
Яровая пшеница по пласту . .	2	10	0	20	110	50	45	100
Яровая пшеница по обороту пласта	6	2	0	10	40	15	0	50
Подсолнечник	9	0	0	0	20	0	0	0
Лесная полоса	0	0	0	0	2	0	0	0
Многолетняя залежь	0	0	0	0	3	0	0	0
Влажность почв в момент взятия проб в %								
Яровая пшеница по пласту . .	25,1	17,9	10,5	30,8				
Яровая пшеница по обороту пласта	25,9	19,4	13,1	32,6				
Подсолнечник	25,5	18,2	11,1	31,2				
Лесная полоса	34,4	24,4	—	—				
Многолетняя залежь	36,9	18,3	17,5	34,5				

Примечание: Опыт проведен в 1951 г., взят слой почвы в 0—10 см.

витие азотобактера часто лимитируется отсутствием соответствующих органических соединений.

О том, что азотобактер в черноземе Каменной степи имеется, но дефицит органического вещества ограничивает его развитие, показывает следующий опыт. Взятая в июле почва, когда азотобактер не обнаруживался даже при анализе методом пластин, увлажнялась и компостировалась в термостате с добавками в одном случае 0,1 % K_2HPO_4, в другом — этой же соли и маннита.

Как видно из данных табл. 6, при внесении в почву органического вещества азотобактер без всякого заражения чрезвычайно обильно размножался.

Таблица 6

Влияние компостирования почвы на развитие азотобактера

(Число колоний на чашку)

Время прошедшее с начала компостирования	Почва из под яровой пшеницы по пласту			Почва с многолетней залежи		
	компостирование с 0,1% K_2HPO_4	компостирование с 0,1% K_2HPO_4 и 0,5% маннита	компостирование с 0,1% K_2HPO_4 и 1% маннита	компостирование с 0,1% K_2HPO_4	компостирование с 0,1% K_2HPO_4 и 0,5% маннита	компостирование с 0,1% K_2HPO_4 и 1% маннита
Исходная проба . .	0	4	3	0	0	0
7 дней . .	0	>1000	>1000	0	0	>1000
14 „ . .	25	>1000	>1000	0	>1000	>1000
21 день . .	46	>1000	>1000	0	>1000	>1000

Сообщенные данные показывают, что при депрессивном состоянии азотобактера в почве он может быть выявлен компостированием при повышенной температуре увлажненного и удобренного образца почвы.

За ограниченностью места мы опускаем здесь материал, подтверждающий положение Красильникова [3] о том, что в одних и тех же почвах распространение азотобактера зависит от характера высшей растительности. Вмешательство растений еще более осложняет закономерности экологии данного микроба.

Следует отметить, что во время печатания настоящей статьи было опубликовано исследование Тепляковой, Ситниковой и Карагуйшиевой [10], вполне подтверждающее наши установки.

Выводы

1. В настоящей работе доказывается, что обнаружение азотобактера в почве весьма часто не удается широко применяемым методом комочков. Значительно лучшие результаты дает прием почвенных пластин.

Лишь в почвах, очень богатых азотобактером, оба метода дают равноценные результаты. При умеренном содержании в почве клеток азотобактера явление антагонизма мешает им прорастать на элективной среде и поэтому метод комочков нередко дает неверные показатели.

2. Как и прочие неспороносные бактерии, азотобактер имеет в почве определенный ритм развития. Являясь влаголюбивым организмом, он размножается в почвах, особенно южной зоны, лишь в периоды весеннего их увлажнения, как эфемер. В более интенсивно увлажняемых почвах он может существовать в продолжение всего вегетационного периода, если этому не препятствуют другие причины.

Отмеченный момент позволяет сделать заключение, что лишь сезонные наблюдения могут дать представление об экологии азотобактера.

3. В некоторых почвах азотобактер находится в депрессивном состоянии. Путем соответствующего удобрения подобных почв и их выдерживания при положительных температурах удается вызвать обильное размножение азотобактера.

4. Приведенные в настоящей статье материалы позволяют правильно подойти к изучению распространения азотобактера в почвах СССР. Ряд выводов, сделанных Сушкиной, считаем основанными на методических ошибках. Их сущность вскрыта в настоящей работе.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Получено 22.XI.1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геллер И. А. и Харитон Е. Г. Азотобактер в почве травопольного севооборота. Микробиология, XX, 113, 1951.
2. Кононова М. М. Микробиологическая характеристика почв некоторых районов Средней Азии. Тр. Ср.-Аз. оп. иссл. ин-та водного хоз-ва, 3 (15), 39, 1930.
3. Красильников Н. А. Влияние корневых выделений на развитие азотобактера и других почвенных микробов. Микробиология, III, 343, 1934.
4. Мишустин Е. Н. Рецензия на работу Н. Н. Сушкиной «Эколого-географическое распространение азотобактера в почвах СССР». Почвоведение, № 8, 501, 1950.
5. Омелянский В. Л. Связывание атмосферного азота почвенными микробами. Научно-техн. изд-во, 1923.
6. Омелянский В. Л. Устойчивость культур Azotobacter chroococcum к высыханию. Тр. отдела с.-х. микробиологии гос. ин-та опытной агрономии, I, 85, 1926.
7. Сушкина Н. Н. Распространение азотобактера в почвах сухих степей и пустынь. ДАН СССР, 31 (3), 291, 1941.
8. Сушкина Н. Н. Эколого-географическое распространение азотобактера в почвах СССР. Изд. АН СССР, 1949.
9. Сушкина Н. Н. Ответ на рецензию Е. Н. Мишустина. Почвоведение, № 3, 183, 1951.
10. Теплякова З. Ф., Ситникова А. С. и Карагуйшиева Д. Распространение азотобактера в некоторых почвах Казахстана. Микробиология, XXII, 164, 1953.

ОБОГАЩЕНИЕ СУБСТРАТА АЗОТИСТЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ПРИ РАЗВИТИИ AZOTOBACTER BEIJERINCKII

И. Л. Работнова и *Г. С. Родионова*

Несмотря на обилие исследований, вопрос о механизме усвоения азота атмосферы азотобактером до сих пор не решен.

Какие промежуточные азотистые соединения образуются между N_2 и азотом аминокислот, из которых состоит белок тела азотобактера?

Может ли процесс азотфиксации быть направлен таким образом, чтобы накапливался не белковый азот тела бактерий, а какие-нибудь промежуточные продукты?

На эти вопросы пока нет исчерпывающих ответов, а есть только различные предположения, хотя и исходящие из экспериментальных фактов, но не доказанные с исчерпывающей убедительностью.

Костычев, Рыскальчук и Швецова [3] обнаружили аммиак в культурах Az. agile при выращивании на жидкой среде с сахаром или маннитом. Это привело Костычева к мысли, что аммиак и является промежуточным продуктом азотфиксации. Однако в этой работе не была проверена чистота культуры и не было полной уверенности в том, что не произошло случайного заражения аммонифицирующими бактериями. В 1931 г. была опубликована вторая работа по тому же вопросу Костычева и Шелоумовой [4]. На этот раз объектом исследования был Az. vinelandii. Было обращено специальное внимание на чистоту культуры. Выращивание велось на твердой и жидкой среде. На кремнекислом геле азотфиксация идет гораздо интенсивнее, чем в жидкой среде. На 2 г маннита усваивается 25—27 мг N. В жидкой среде выращивание велось при непрерывной аэрации, что значительно улучшает развитие. В обоих случаях в культурах был обнаружен аммиак. Костычев считает, что аммиак имеет двойственную природу: в начале развития культуры в среде накапливается аммиак — первый продукт азотфиксации в количестве 1—2 мг N на 150 мл. После исчерпания запаса энергетического вещества в среде накапливается аммиак другого происхождения — продукт автолитического дезаминирования.

Эта точка зрения была далее развита Виноградским [1]. Он также считает, что азотфиксация идет путем восстановления азота водородом. Сперва он предполагает образование гидразина, затем аммиака. Образовавшийся аммиак может потребляться азотобактером таким же путем, как он потребляется всеми другими микроорганизмами. В некоторых условиях, например при задержке роста при развитии за счет щелочных солей органических кислот, когда среда сильно подщелачивается, возможно нарушение слаженности процесса фиксации, т. е. образования аммиака и потребления аммиака на конструктивные цели. Фиксация идет довольно энергично, а потребление задерживается. В этом случае в среде накапливается аммиак.

Виноградскому удалось обнаружить аммиак, выделяемый культурами Az. chroococcum, Az. agile, Az. vinelandii, развивающимися на щелочных солях органических кислот на пластинках кремнекислого геля. Более того, им обнаружено выделение аммиака убитыми клетками, причем баланс азотистых веществ показывает, что этот аммиак имеет двойное происхождение: часть его — продукт азотфиксации, а часть — продукт автолитического дезаминирования. Количество выделенного аммиака достигает 5 мг на чашку у живых культур и долей миллиграмма у мертвых клеток.

Между работами Костычева и Виноградского имеется противоречие. Костычев наблюдал выделение аммиака при выращивании на средах с сахаром, а Виноградский указывает, что при развитии на сахаре выделения аммиака не происходит, так как он нацело потребляется обильно развивающейся культурой. Выделение аммиака удается наблюдать при развитии на щелочных солях органических кислот, когда размножение не успевает за азотфиксацией.

Буткевич и Колесникова в 1941 г. нашли аммиак [1] в культуре Az. chroococcum на среде с глюкозой при непрерывном взбалтывании. При этом авторы подчеркивают, что выделение аммиака наблюдается до исчерпания энергетического вещества. Это свидетельствует о том, что здесь нет процесса автолиза. Количества аммиака, обнаруженные в этой работе, исключительно велики — до 15 мг на 100 мл.

---

[1] См. «Микробиология почвы» [2], раздел «Азотобактер», сообщ. 1930 и 1932 гг.

Новейшие наблюдения над выделением азотистых веществ в культурах азотобактера принадлежат Федорову [8, 9]. Он считает, что при фиксации азота последний соединяется с ферментом, составляющим неотделимую часть живой клетки. При этом образуется группа HN — NH. Далее, этот азот соединяется с кетокислотами, обра-
| |
зующимися при использовании органических веществ, и получаются аминокислоты, составляющие белок тела. Федоров предполагает, что если добавить в среду кетокислоты или другие соединения с ненасыщенной связью, то фиксированный азот HN — NH может быть отвлечен в среду в виде соответствующих аминокислот. Он не
| |
считает аммиак промежуточным продуктом при азотфиксации [10]. Федоров выращивал Az. agile в колбах на среде с сахаром и с добавлением сверх того натриевых солей пировиноградной, аконитовой и фумаровой кислот, а также с добавлением веществ, могущих дать при распаде соединения с ненасыщенной связью, хинной и лимонной кислот. Через 2—4 недели в растворе, отделенном от клеток, было найдено до 60—70% от всего фиксированного азота. Это не был азот аммиака (проба с реактивом Несслера), природа его осталась неизвестной. Однако ввиду длительности опытов нельзя быть уверенным, что автор не имел дела просто с автолизом клеток. В работе не упоминается о том, какова была микроскопическая картина культуры в момент снятия опыта, не наблюдался ли распад клеток, который обычно бывает хорошо заметен.

Имеются данные и противоположного характера. Так, Миненков в 1928 г. [5] исследовал Az. chroococcum на среде с маннитом в колбах и при выращивании на песке, смоченном той же средой, при аэрации. При этом выделения аммиака он не обнаружил. Аналогичные опыты были проделаны Робергом (Roberg [11]). Азотобактер выращивался в колбах на среде с сахаром от 2 до 80 дней. При этом в фильтрате культуры было обнаружено 0,5—1,5 мг N на 100 мл в первый период роста и далее до 50% всего связанного азота. Автор рассматривает этот азот как продукт автолиза.

Такая неясность в вопросе о накоплении азотистых веществ в культурах азотобактера побудила нас попытаться исследовать этот вопрос. Чтобы исключить возможность автолиза, мы исследовали исключительно молодые культуры, двух-, трехсуточные, реже более старые, при выращивании при непрерывной аэрации. При этом все клетки находятся в одинаковых условиях, и можно ожидать, что мы избегнем такого явления, когда в отдельных местах еще молодой культуры могут быть преждевременно состарившиеся клетки в состоянии автолиза. Это бывает лишь в тех случаях, когда микроорганизмы растут в виде пленки, на поверхности которой клетки стареют раньше, чем в глубине, из-за затруднения в снабжении питательными веществами.

Экспериментальная часть

Культура

Для работы нами был выделен свежий штамм азотобактера. Выделение производилось с корней злаков по методу Петренко [6]. Отмытые корешки ржи и пшеницы раскладывались на кремнекислый гель, пропитанный питательным раствором[2]. Через несколько дней вокруг корешков вырастали желтые колонии азотобактера. Эта разновидность азотобактера, является той, которую Петренко считает специфической для злаков [6]. Из колоний, выросших вокруг корешков, мы выделяли чистую культуру, взбалтывая суспензию бактерий в стерильной воде с песком и делая высевы на чашки с агаровой средой Эшби[3]. Таким путем удается получить чистые культуры азотобактера. При посеве на МПА они или вовсе не дают роста, или вырастают очень слабо, если взято большое количество посевного материала. Под микроскопом при этом видны лишь клетки азотобактера — крупные, часто неправильной формы. По определителю Берджи, этот вид больше всего подходит к Az. Beijerinckii. Для более полной характеристики выделенного нами азотобактера можно еще привести следующие данные: в жидкой среде, налитой тонким слоем, развивается очень слабо, на поверхности агара или кремнекислого геля развивается хорошо и фиксирует до 27,5 мг азота в пересчете на 100 мл твердой среды за четыре дня. Оптимальные условия кислотности определялись при выращивании на жидкой и на твердой среде

---

[2] Состав солевого раствора: KH_2PO_4 — 1 г, NaCl — 0,3 г, $MgSO_4$ — 0,3 г, $FeSO_4$ — 0,02 г, $MnSO_4$ — 0,02 г., дестиллированной воды — 200 мл. На чашку Петри вносится 2 мл раствора, 0,3 г мела и 0,3 г декстрина.

[3] Состав среды: K_2HPO_4 — 0,2 г, $MgSO_4$ — 0,2 г, NaCl — 0,2 г, K_2SO_4 — 0,1 г, Na_2MoO_4 — 0,01 г, декстрин — 10 г на 1 л водопроводной воды.

с добавлением фосфатных буферов. В жидкой среде клетки подсчитывались в камере Тома через три дня, на твердой среде отмечался характер штриха на скошенном агаре. Как можно видеть из данных табл. 1, оптимум pH находится при pH-6,36, причем на твердой среде хороший рост наблюдается в более широком диапазоне pH, чем на жидкой.

Таблица 1

Развитие Az. Beijerinckii при различных pH на жидкой и агаровой среде

pH	Жидкая среда	Твердая среда
	количество клеток в млн/мл	характер роста
8,60	2,4	Роста нет
8,37	2,8	Слабый рост
7,90	5,6	Хороший рост
7,64	8,4	» »
7,28	12,8	» »
6,90	16,8	» »
6,60	21,2	» »
6,36	36,4	» »
6,00	20,0	Слабый рост
5,77	17,2	» »
5,37	9,6	Очень слабый рост

Методика

Опыты велись в делительных воронках на 300 мл. В горлышки воронок были вставлены стеклянные трубки таким образом, чтобы через жидкость, налитую в них, можно было протягивать воздух при помощи водоструйного насоса. Входящий воздух проходил через раствор 20% H_2SO_4 для очищения от аммиака и через ватный фильтр для стерилизации. Выращивание велось при 30° при круглосуточной сильной аэрации (без распыления воздуха). По ходу развития культуры отбирались пробы культуральной жидкости. В них определялось количество клеток подсчетом в камере Тома, общее содержание азота микрометодом Кьельдаля в аппарате Вагнера с серебряным холодильником и общее содержание азота в фильтрате культуры, отфильтрованной через мембранный фильтр. Для сжигания бралось по 2 мл жидкости. Максимальная ошибка определения не превышает 0,5 мг N на 100 мл среды.

Во всех опытах применялась вышеупомянутая среда. В качестве источника углерода применялись сахара и соли органических кислот.

Опыты на среде с сахарозой (2%)

Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Развитие азотобактера и азотофиксация на среде с сахарозой

Время в час.	Количество клеток в млн/мл	Количество N в культуре в мг/100 мл	Количество N в фильтрате культуры в мг/100 мл	Количество N в культуре в мг в пересчете на 1 клетку
0	4			
26	270	3,65	0	$1{,}3 \cdot 10^{-10}$
35	336	6,61	0,81	$1{,}9 \cdot 10^{-10}$
48	392	7,7	0,54	$1{,}9 \cdot 10^{-10}$

Как можно видеть из данных табл. 2, развитие на сахарозе было обильным. Количество клеток за 48 часов достигало почти 400 млн. на 1 мл среды. В фильтрате обнаружены лишь следы азота. На одну клетку приходится $1{,}3—1{,}9 \times 10^{-10}$ мг общего азота, содержащегося в культуре в целом (культуральная жидкость плюс клетки).

Специальные наблюдения окрашенных препаратов по ходу развития азотобактера показывают, что величина клеток в период интенсивного размножения мало меняется. Можно отметить некоторое увеличение объема одиночных клеток в начальный период (менее чем в два раза), но наличие большого количества более мелких парных клеток не позволяет принять это в расчет. Мы сочли возможным пользоваться пересчетом количества азота на одну клетку, как косвенным показателем накопления азота в среде. Несомненно, что белок тела азотобактера должен

содержать определенное, мало изменяющееся количество азота. В тех случаях, когда при анализе культуры (клетки плюс жидкость) на одну клетку приходится азота в 3—4 раза больше, мы вправе считать, что имеет место накопление азота в жидкости.

pH среды в конце опыта был нейтральный.

Опыты на среде с маннитом (2%)

Опыты велись в двух делительных воронках, соединенных последовательно. Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Развитие азотобактера и азотфиксация на среде с маннитом

Время в час.	Количество клеток в млн/мл		Количество N в культуре в мг/100 мл		Количество N в культуре в мг в пересчете на 1 клетку	
	номера сосудов					
	I	II	I	II	I	II
0	4	4				
3	5,6	4,8				
6	8,8	7,2				
9	11,6	10,4				
25	146,4	134,4	3,8	3,5	$2{,}6\times10^{-10}$	$2{,}6\times10^{-10}$
28	151,2	145,2	4,3	3,7	$2{,}8\times10^{-10}$	$2{,}4\times10^{-10}$
31	160,8	156,0	6,5	4,3	$4{,}0\times10^{-10}$	$2{,}7\times10^{-10}$
34	171,6	163,2	6,5	5,5	$3{,}4\times10^{-10}$	$3{,}3\times10^{-10}$
49	175,2	180,0	9,0	6,0	$5{,}1\times10^{-10}$	$3{,}3\times10^{-10}$

Как видно из данных табл. 3, развитие на манните хорошее, хотя и несколько хуже, чем на сахарозе. На одну клетку приходится до $3{,}3\times10^{-10}$ мг азота. На 49-м часу в сосуде I получилась величина $5{,}1\times10^{-10}$, но, судя по динамике размножения, в этот период уже возможен был автолиз клеток. В среде в это время могли быть вещества, перешедшие в раствор из автолизировавшихся клеток, почему и получилось повышение количества азота в среде в пересчете на одну клетку.

Опыты на среде с ацетатом натрия (0,5%)

Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4

Развитие азотобактера и азотфиксация на среде с ацетатом натрия

Время в час.	Количество клеток в млн/мл		Количество N в культуре в мг/100 мл		Количество N в фильтрате в мг/100мл		Количество N в культуре в мг в пересчете на 1 клетку		Количество N в культуре, за вычетом азота фильтрата в пересчете на 1 клетку	
	номера сосудов									
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	4,4	4,4								
3	4,8	6,0								
6	7,6	9,6		0,8				$8{,}3\times10^{-10}$		
9	11,6	11,2	1,0	1,6	0,8	0,6	$8{,}6\times10^{-10}$	$14{,}3\times10^{-10}$	$1{,}7\times10^{-10}$	$8{,}6\times10^{-10}$
24	66,8	56,8	3,9	3,6	1,5	1,5	$5{,}8\times10^{-10}$	$6{,}3\times10^{-10}$	$3{,}0\times10^{-10}$	$3{,}7\times10^{-10}$
27	68,8	58,0	4,2	4,5	2,9	1,5	$6{,}0\times10^{-10}$	$7{,}7\times10^{-10}$	$1{,}8\times10^{-10}$	$5{,}1\times10^{-10}$
30	89,6	74,0	4,9	5,0			$5{,}4\times10^{-10}$	$6{,}8\times10^{-10}$		
33	72,8	64,8	5,0	5,5			$6{,}8\times10^{-10}$	$8{,}4\times10^{-10}$		

В естественных местообитаниях азотобактер едва ли может иметь в своем распоряжении сахара. Виноградским впервые высказано и обосновано предположение, что естественным источником углерода для азотобактера являются органические кислоты — продукты обмена его предшественников в почве. Поэтому нам представляется, что правильнее считать нормальным развитие на кислотах, а обильный рост на сахарах — рассматривать как случай стимуляции развития.

На ацетате натрия урожай клеток ниже, чем на сахарозе или манните, и достигает 70—80 млн. на 1 мл. pH среды в конце опыта был равен 9,0, чем и можно объяснить более слабое развитие. Однако, несмотря на это, азотфиксация достигает 5,5 мг N на 100 мл. При этом значительная часть азота — до 2,9 мг — находится в фильтрате. Интересно отметить, что азот в фильтрате появляется уже в первые сутки развития культуры, в момент самого интенсивного размножения. При пересчете количества азота во всей культуре в целом на одну клетку мы получаем более высокие цифры, чем в опытах с сахаром,— $8{,}6 \times 10^{-10}$ и даже $14{,}3 \times ^{-10}$. Если же сделать расчет количества азота на одну клетку, считая только тот азот, который содержится в самих клетках, т. е. из общего азота в культуре вычесть азот в фильтрате, то мы получим приблизительно такие же цифры, как мы получали при росте на сахарозе и манните. Это показывает, что азотобактер при развитии, заторможенном щелочной реакцией, фиксирует азот в таком количестве, которое он не может использовать на построение своего тела, и этот излишний азот оказывается в среде.

При развитии на сахарах азот в среду не выделяется, так как весь идет на построение большого количества клеток, которое вырастает благодаря стимулирующему действию сахаров.

Опыты на среде с маслянокислым натрием (0,5%)

Результаты приведены в табл. 5.

Таблица 5

Развитие азотобактера и азотфиксация на среде с маслянокислым натрием

Время, в час	Количество клеток в млн/мл		Количество N в культуре в мг/100 мл		Количество N в фильтрате в мг/100 мл		Количество N в культуре в мг в пересчете на 1 клетку		Количество N в культуре, за вычетом азота фильтрата в пересчете на 1 клетку	
	номера сосудов									
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	4,8	4,4								
7	6,0	4,4								
22	30,0	19,6	1,35	0,95	0	0	$4{,}5 \times 10^{-10}$	$4{,}8 \times 10^{-10}$		
26	46,4	33,2	1,89	1,76	0,94	0,94	$4{,}0 \times 10^{-10}$	$5{,}3 \times 10^{-10}$	$2{,}0 \times 10^{-10}$	$2{,}5 \times 10^{-10}$
30	53,6	67,6	2,26	2,43	0	0,7	$4{,}2 \times 10^{-10}$	$3{,}6 \times 10^{-10}$		$2{,}5 \times 10^{-10}$
46	60,4	72,0	2,43	3,38	1,3	1,3	$4{,}0 \times 10^{-10}$	$4{,}7 \times 10^{-10}$	$1{,}8 \times 10^{-10}$	$2{,}8 \times 10^{-10}$

На маслянокислом Na картина приблизительно такая же, как и на ацетате Na.

Количество клеток составляет 60—70 млн.. на 1 мл, в фильтрате обнаруживается заметное количество азота, pH = 8,6, в сосуде I и pH = 9,0 — в сосуде II.

Опыты на среде с молочнокислым натрием (0,5%)

Результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

Развитие азотобактера и азотофиксация на среде с молочнокислым натрием

Время в час.	Количество клеток в млн/мл		Количество N в культуре в мг/100 мл		Количество N в фильтрате в мг/100 мл		Количество N в культуре в мг в пересчете на 1 клетку		Количество N в культуре, за вычетом азота фильтрата в пересчете на 1 клетку	
	номера сосудов									
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	4,4	4,8								
7	7,2	6,4	0,13	0,13			$1,8\times10^{-10}$	$2,0\times10^{-10}$		
22	73,6	80,8	2,26	2,29	0,9	1,0	$3,0\times10^{-10}$	2.8×10^{-10}	$1,9\times10^{-10}$	$1,5\times10^{-10}$
23	92,9	98,8	3,1	3,5	1,2	1,6	$3,3\times10^{-10}$	$3,6\times10^{-10}$	$2,0\times10^{-10}$	$2,0\times10^{-10}$
45	108,8	99,2	4,0	4,32	1,6	1,9	$3,7\times10^{-10}$	$4,4\times10^{-10}$	$2,2\times10^{-10}$	$2,4\times10^{-10}$

На молочнокислом натрии pH = 9,0 в конце опыта. Общая картина развития такая же, как и на вышеупомянутых натриевых солях уксусной и масляной кислот.

Опыты на среде с молочнокислым кальцием (0,5%)

Результаты приведены в табл. 7.

Таблица 7

Развитие азотобактера и азотфиксация на среде с молочнокислым кальцием

Время в час.	Количество клеток в млн./мл		Количество N в культуре в мг/100 мл		Количество N в фильтрате в мг/100 мл		Количество N в культуре в пересчете на 1 клетку	
	номера сосудов							
	I	II	I	II	I	II	I	II
0	3,6	2,8						
4	1,8	3,6						
8	6,4	8,0						
24	116,8	122,0	0,5	0,65	0	0	$0,4\times10^{-10}$	$0,5\times10^{-10}$
28	168,8	158,4	1,8	1,45	0	0	$1,0\times10^{-10}$	$0,9\times10^{-10}$
32	176,4	159,2	2,1	1,45	0	0	$1,2\times10^{-10}$	$0,9\times10^{-10}$
50	267,6	216,8	2,8	2,75	0	0	$1,0\times10^{-10}$	$1,2\times10^{-10}$
55	280,0	193,6	3,0	2,75	0	0	$1,0\times10^{-10}$	$1,4\times10^{-10}$
73	262,4	182,4	3,4	2,75			$1,3\times10^{-10}$	$1,4\times10^{-10}$

Реакция среды в конце опыта была нейтральной. Развитие было очень хорошим. Однако количество фиксированного азота относительно невелико — 2,75—3,4 мг на 100 мл. В фильтрате азота не обнаружено. Очевидно, весь фиксированный азот израсходован на построение белка тела азотобактера. Количество азота, приходящееся на одну клетку, особенно низкое: $0,5—1,4\times10^{-10}$.

Обсуждение результатов

Как видно из приведенных данных, азотобактер особенно интенсивно размножается на сахарозе, манните и лактате кальция. При этом весь фиксированный азот тратится на построение белка тела азотобактера.

На натриевых солях уксусной, масляной и той же молочной кислоты рост менее обильный. Происходит сильное подщелочение среды до pH = 9, что в значительной степени и обуславливает более слабое развитие. Между тем азот фиксируется довольно энергично. Значительная часть фиксированного азота обнаруживается в фильтрате культуры. Если сопоставить количество клеток и количество фиксированного азота в культуре в целом (фильтрат + клетки), то оказывается, что чем лучше развитие, тем меньше азота приходится в одну клетку. И, наоборот, чем хуже развитие, тем больше азота приходится на одну клетку. Это хорошо видно из приводимой ниже сводной таблицы (табл. 8).

Таблица 8

Зависимость количества фиксированного азота, приходящегося на одну клетку от интенсивности размножения

Урожай клеток в млн/мл	Фиксированный азот на 1 клетку	Источник углерода
до 400	$1—2\times10^{-10}$	Сахароза
220—280	$1—1{,}4\times10^{-10}$	Лактат Ca
180	$2{,}5—3{,}5\times10^{-10}$	Маннит
100	$3—4\times10^{-10}$	Лактат Na
60—70	$4—5\times10^{-10}$	Маслянокислый Na
60—70	$6—8\times10^{-10}$	Ацетат Na

Это свидетельствует о том, что при менее обильном развитии часть фиксированного азота не используется клетками, а находится в среде. Об этом же говорит и прямое определение азота в фильтрате культуры — до 2 мг и более на 100 мл фильтрата. Если же рассчитать количество азота, приходящегося на одну клетку, взявши в расчет только тот азот, который приходится на самые клетки, т. е. из общего азота в культуре вычесть азот фильтрата, то, грубо говоря, на одну клетку приходится постоянное количество азота, в пределах $1—3\times10^{-10}$ (исключение представляет сосуд II в опыте с ацетатом Na, что может быть отнесено за счет случайности). Надо особенно подчеркнуть то, что азот в фильтрате культуры обнаруживается уже к концу первых суток развития культуры, когда еще не может быть и речи об автолизе клеток. Однако при помощи реактива Несслера нам не удалось обнаружить аммиака.

Все эти факты подтверждают теорию Виноградского, согласно которой азотфиксация — двухфазный процесс. Сперва идет синтез стабильного промежуточного продукта, а затем его потребление на построение тела. Если потребление идет не слишком быстро, как это бывает на щелочных солях органических кислот, продукт накапливается в среде. Чем обильнее развитие, тем меньше обогащение среды азотом. Однако, в отличие от результатов, полученных Виноградским, промежуточный продукт — не аммиак, так как с реактивом Несслера не получается типичного желтого окрашивания. Эта наша работа подтвердила результаты, полученные нами ранее [7].

Выводы

1. Azotobacter Beijerinckii, выделенный с корней ржи, хорошо развивается в жидкой безазотистой среде при непрерывной аэрации и на твердой среде, значительно хуже в жидкой неподвижной среде, налитой тонким слоем. Оптимальное pH = 6,36.

2. На безазотистой среде с сахарозой, маннитом и лактатом Ca — развитие обильное, до 200—400 млн. клеток в 1 мл. При этом в филь-

трате культуры азотистых веществ не обнаружено. На щелочных солях органических кислот — уксусной, масляной и молочной — происходит подщелочение среды до pH = 9 и развитие менее обильное. Урожай клеток не превышает 100 млн. на 1 мл. При этом в фильтрате молодой, активно размножающейся культуры обнаружены азотистые вещества (не аммиак) в количестве до 2 мг N и более на 100 мл.

3. Указанные факты находятся в соответствии с теорией Виноградского о двухфазности процесса азотфиксации, однако промежуточный продукт фиксации — не аммиак. Природа его не установлена.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Биолого-почвенный
научно-исследовательский институт

Получено 8.X.1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буткевич Б. С. и Колесникова Н. А. Об образовании аммиака при фиксации молекулярного азота азотобактером. ДАН СССР, 33, № 1, 66, 1941.
2. Виноградский С. Н. Микробиология почвы, Изд-во АН СССР, М., 1952.
3. Костычев С. П., Рыскальчук А., Швецова О. Биохимические исследования над Azotobacter agile. Тр. Отд. с.-х. микробиологии Гос. ин-та опытной агрономии, 1, 91, 1926.
4. Костычев С. П., Шелоумова А. М. Связывание атмосферного азота и образование аммиака азотобактером. Изв. Акад. Наук СССР, № 5, 661, 1931.
5. Миненков А. Р., Образование аммиака при связывании молекулярного азота микробом Azotobacter chroococcum. Изв. с.-х. акад. им. Тимирязева, № 3, 116, 1928.
6. Петренко Г. Я. Производственное значение препаратов азотобактера. Тр. Ин-та зернового хозяйства нечерноз. полосы, вып. 14, стр. 45, 1949.
7. Работнова И., Кондратьева Е., Нетте И., Аронес З. Фиксация азота атмосферы азотобактером при различных условиях аэрации. Микробиология, XVIII, 509, 1949.
8. Федоров М. В. Биологическая фиксация азота атмосферы. Сельхозгиз. 1952.
9. Федоров М. В. Об аммиаке как первичном продукте фиксации молекулярного азота бактериями. Микробиология, XXI, 348, 1952.
10. Федоров М. В., Частичное отвлечение продуктов фиксации молекулярного азота из клетки азотобактера в питательную среду. Микробиология, XXI, 395, 1952.
11. Roberg M. Der Stickstoffgehalt der Filtrate von Azotobacter. Jahrb. wiss. Bot., 82, 65, 1935.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ. I

Е. А. Штерн

Систематика клубеньковых бактерий по их морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам затруднительна из-за сходства этих свойств у различных представителей этой группы микробов. Поэтому для дифференциации клубеньковых бактерий уже давно применялись серологические методы исследования.

Однако до сих пор подробного анализа антигенного аппарата культур не производилось.

Первая серия наших опытов по изучению серологических особенностей клубеньковых бактерий проводилась с небольшим количеством музейных культур (по два штамма для каждой разновидности). В дальнейшем количество культур для исследования было значительно увеличено (92 культуры) благодаря содействию лаборатории бактериальных удобрений Всесоюзного института сельскохозяйственной микробиологии.

Для всех серологических исследований клубеньковые бактерии выращивались на бобовом агаре при температуре 26—28°. Кролики иммунизировались интравенозно взвесью живых или убитых кипячением микробов [1]. Иммунизация проводилась двумя циклами с промежутками

Таблица 1

Данные по перекрестной агглютинации с живыми культурами клубеньковых бактерий

Наименование клубеньковых бактерий (живые культуры)	Сыворотки, полученные иммунизацией кроликов живыми бактериями						
	люцерны	донника	клевера	вики	конских бобов	фасоли	гороха
Люцерна	+++	++	++	++	—	—	—
Донник	++	+++	++	++	—	—	—
Клевер	++	++	+++	++	—	—	—
Вика	++	++	++	+++	—	—	—
Конские бобы	—	—	—	—	+++	++	++
Фасоль	—	—	—	—	++	+++	++
Горох	—	—	—	—	++	++	+++

Примечание. +++ агглютинация до титра: ++ агглютинация в пределах $^1/_2$—$^1/_4$ титра; + агглютинация $^1/_4$ титра: ± агглютинация на низких разведениях; — отрицательные результаты

между ними в восемь дней и в четыре дня между инъекциями. В первом цикле вводилось 50—100—500—1000 млн. микробов; во втором цикле в первый и во второй раз по 1, а в третий и четвертый раз по 2 млрд. Кролики обескровливались на восьмой день после последней инъекции.

Титр сывороток в агглютинационных опытах обычно достигал 12 800. Изучение серологических особенностей клубеньковых бактерий было

[1] В дальнейшем убитые кипячением микробы называются для краткости «кипяченые».

начато с перекрестной агглютинации. Опыты ставились с живыми культурами и с сыворотками, полученными иммунизацией кроликов живыми микробами.

Результаты опытов представлены в табл. 1.

Из таблицы видно, что имевшиеся в нашем распоряжении клубеньковые бактерии разбились на две серологические группы: первая группа — люцерны, донника, клевера, вики и вторая группа — конских бобов, фасоли и гороха.

При этом сыворотки агглютинировали до титра гомологичные культуры и реагировали слабее, до $^1/_2$ титра, с другими культурами своей серологической группы.

Далее были поставлены опыты перекрестной агглютинации с теми же сыворотками, но с кипяченными культурами. Для разрушения термолабильных агглютиногенов смытые физиологическим раствором культуры клубеньковых бактерий прогревались в течение двух часов в водяной бане при температуре 100°.

Результаты опытов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Данные по перекрестной агглютинации с убитыми кипячением клубеньковыми бактериями

Наименование клубеньковых бактерий	Сыворотки, полученные иммунизацией кроликов живыми бактериями						
	люцерны	донника	клевера	вики	конских бобов	фасоли	гороха
Люцерна	+++	+++	+++	+++	++	++	++
Донник	+++	+++	+++	+++	++	++	++
Клевер	+++	+++	+++	+++	++	++	++
Вика	+++	+++	+++	+++	++	++	++
Конские бобы	++	++	++	++	+++	+++	+++
Фасоль	++	++	++	++	+++	+++	+++
Горох	++	++	++	++	+++	+++	+++

Как видно, в этом случае везде наблюдалась положительная реакция. При этом сыворотки агглютинировали до титра не только гомологичные штаммы, но и остальные культуры своей группы. Вместе с тем они реагировали и с кипяченными культурами другой серологической группы, хотя и заметно слабее (до $^1/_2$ титра).

Надо отметить, что этот результат не связан с неспецифической агглютинабильностью кипяченых культур, так как в контрольных опытах те же кипяченые культуры не реагировали с чуждыми сыворотками, полученными при иммунизации кроликов Staphyloccus aureus, Proteus vulgaris, Azotobacter chroococcum.

Эти предварительные опыты давали основание полагать, что культуры клубеньковых бактерий имеют общий термостабильный антиген.

Для более полной характеристики стабильного антигена были приготовлены сыворотки иммунизацией кроликов взвесью микробов, предварительно прокипяченных в течение двух часов. С полученными сыворотками были испытаны в перекрестных опытах живые и кипяченые микробы. Оказалось, что иммунизация кроликов кипяченными бактериями дает сыворотку, которая реагирует со всеми кипяченными культурами клубеньковых бактерий, но с живыми микробами только своей серологической группы.

Полученные результаты заставляли признать наличие общего для всех (взятых в опытах) клубеньковых бактерий термостабильного антигена. Однако он не связывал антитела, если опыты ставились с живыми культурами. Это, повидимому, объяснялось глубоким расположением этого антигена.

Способность общего термостабильного антигена клубеньковых бактерий вызывать образование антител выступала вполне отчетливо, так как все кипяченые культуры агглютинировались каждой из сывороток.

Реагирование живых микробов лишь с сыворотками своей группы указывало на то, что при иммунизации кипяченными культурами получаются сыворотки, содержащие антитела не только против общего стабильного антигена, но и против каких-то других, также термостабильных антигенов, свойственных той или другой серологической группе.

Эти групповые термостабильные антигены отличаются от общего стабильного антигена тем, что они не маскировались в опытах с живыми микробами, что давало основание предполагать о более поверхностном их расположении.

В итоге можно было построить следующую схему (табл. 3).

Таблица 3

Комплекс антигенов клубеньковых бактерий

Первая серологическая группа			Вторая серологическая группа		
Бактерии люцерны, донника, клевера, вики			Бактерии конских бобов, фасоли, гороха		
Антигены			Антигены		
термолабильные	термостабильные		термолабильные	термостабильные	
	поверхностные	глубокие		поверхностные	глубокие
a*	c	b	d	e	b

* Обозначения даны условно.

Для проверки этой схемы были проведены опыты истощения агглютининов [1].

С этой целью из каждой серологической группы были взяты по две сыворотки, полученные иммунизацией кроликов в одном случае живыми, а в другом кипяченными бактериями. Таким образом, в опыте имелось четыре сыворотки, из которых каждая истощалась четырьмя культурами, т. е. было получено 16 различно обработанных сывороток, которые в свою очередь испытывались со всеми четырьмя культурами.

Результаты опытов приведены в табл. 4.

Таблица 4

Истощение агглютининов культурами клубеньковых бактерий

(Сыворотка, полученная иммунизацией кроликов живыми бактериями люцерны ACB

Наименование клубеньковых бактерий	Истощается				После истощения остаются антитела в сыворотке	Какие культуры могут агглютинироваться после истощения
	люцерной		конскими бобами			
	живой к-рой acb	кипяч. к-рой cb	живой к-рой deb	кипяч. к-рой eb		
Люцерна, живая к-ра	—	++	+++	+++	B	Люцерна, кипяч. к-ра. Конские бобы, кипяч. к-ра
Люцерна, кипяч. к-ра	+	—	++	++	A	Люцерна, живая к-ра.
Конские бобы, живая к-ра	—	—	—	—	ACB	Люцерна, живая к-ра. Люцерна, кипяч. к-ра. Конские бобы кипяч. к-ра
Конские бобы, кипяч. к-ра	+	—	+	—	AC	Люцерна, живая к-ра. Люцерна, кипяч. к-ра.

Как видно, сыворотка, полученная иммунизацией кролика живыми бактериями люцерны, истощенная гомологичной живой культурой, продолжает реагировать (до $^1/_4$ титра) с кипяченными микробами люцерны и конских бобов. Это подтверждает схему (табл. 3), по которой в обеих культурах имеется глубоко расположенный термостабильный антиген (b); соответствующие антитела в сыворотке не извлекаются при обработке ее живыми неразрушенными бактериальными клетками и могут реагировать с кипяченными культурами.

При насыщении той же сыворотки кипяченными бактериями люцерны, как и следовало ожидать, из сыворотки были извлечены антитела к антигенам b и c и остались лишь антитела, обозначенные А. Таким образом, сыворотка агглютинировала только гомологичную живую культуру.

Истощение сыворотки живыми бактериями конских бобов могло повести лишь к некоторому снижению титра антител в отношении общего антигена b.

Поэтому, как и следовало ожидать, после такой обработки сыворотка попрежнему реагировала с гомологичной живой культурой (за счет антигенов a и c), с гомологичной кипяченой культурой (за счет антигенов c и b) и с гетерологичной кипяченой культурой (за счет антигена b).

Наконец, сыворотка была истощена кипяченными бактериями конских бобов, что должно было извлечь антитела в отношении антигена b, но оставить антитела к антигенам a и c, а следовательно, должны были агглютинироваться живые и кипяченые культуры люцерны. Опыты с сывороткой, полученной иммунизацией кроликов живыми бактериями конских бобов, дали результаты, которые также подтвердили приведенную схему.

Кроме этих исследований, проведены были аналогичные опыты с сыворотками, полученными иммунизацией кроликов кипяченными микробами (табл. 5).

Таблица 5

Истощение агглютининов культурами клубеньковых бактерий

(Сыворотка, полученная иммунизацией кроликов кипяченными бактериями люцерны СВ)

Наименование клубеньковых бактерий	Истощается				После истощения остаются антитела в сыворотке	Какие культуры могут агглютинироваться после истощения
	люцерной живой к-рой acb	люцерной, кипяч. к-рой cb	конскими бобами, живой к-рой deb	конскими бобами, кипяч. к-рой eb		
Люцерна, живая к-ра	—	—	++	++	B	Люцерна, кипяч. к-ра. Конские бобы, кипяч. к-ра.
Люцерна, кипяч. к-ра	+	—	++	+	—	—
Конские бобы, живая к-ра	—	—	—	—	CB	Люцерна, живая к-ра Люцерна, кипяч. к-ра. Конские бобы кипяч. к-ра.
Конские бобы, кипяч. к-ра	+	—	++	—	C	Люцерна, живая к-ра. Люцерна, кипяч. к-ра

Сыворотка (иммунизация кипяченными бактериями люцерны) могла содержать, согласно принятой схеме, лишь антитела против антигенов c и b. Истощение живой гомологичной культурой могло извлечь антитела

к антигену c. После этого сыворотка должна была реагировать с кипяченными бактериями как люцерны, так и конских бобов (за счет антигена b).

При насыщении кипяченой гомологичной культурой сыворотка истощалась полностью.

Насыщение той же сыворотки живыми бактериями конских бобов не должно было извлечь каких-либо антител, и следовало ожидать, что сыворотка будет реагировать с живыми культурами люцерны (за счет c и b), с кипяченными бактериями люцерны (за счет тех же антигенов) и с кипяченными бактериями конских бобов (за счет b).

Наконец, истощение сыворотки кипяченой культурой конских бобов должно было убрать антитела к b и оставить антитела к c, и за счет этого происходила агглютинация живых и кипяченых бактерий люцерны.

Результаты опытов с сывороткой, полученной иммунизацией кроликов кипяченными бактериями конских бобов, также подтвердили приведенную схему.

Следующий раздел работы был посвящен анализу взаимоотношений между культурами одной серологической группы.

С этой целью сыворотки, полученные иммунизацией кроликов живыми бактериями люцерны, донника, клевера и вики, были изучены в опытах перекрестного истощения. Каждая из сывороток насыщалась четырьмя культурами (люцерны, донника, клевера и вики). Полученные 16 различных обработанных сывороток испытывались в реакции агглютинации со всеми четырьмя культурами.

Результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

Данные опыта перекрестного истощения сывороток, полученных из клубеньковых бактерий первой серологической группы

Наименование клубеньковых бактерий	Сыворотка бактерий люцерны ACBFG истощается живыми культурами				Сыворотка бактерий донника ACB(F)G истощается живыми культурами			
	люцерны acbfg	донника acb(f)g	клевера acbf(g)	вики abfg	люцерны acbfg	донника acb(f)g	клевера acbf(g)	вики abfg
Люцерна	—	+++	++	+++	—	++	++	++
Донник	—	—	+	++	—	—	++	++
Клевер	—	++	—	++	—	+	—	++
Вика	—	++	++	—	—	+	++	—

Наименование клубеньковых бактерий	Сыворотка бактерий клевера ACBF(G) истощается живыми культурами				Сыворотка бактерий вики ABFG истощается живыми культурами			
	люцерны acbfg	донника acb(f)g	клевера acbf(g)	вики abfg	люцерны acbfg	донника acb(f)g	клевера acbf(g)	вики abfg
Люцерна	—	++	++	++	—	+	++	—
Донник	—	—	+	+	—	—	++	—
Клевер	—	++	—	++	—	+	—	—
Вика	—	+	++	—	—	+	++	—

Как видно, сыворотка, полученная иммунизацией кроликов живыми бактериями люцерны, истощалась гомологичным штаммом и не агглютинировала после этого остальные живые культуры. Насыщение же сыворотки бактериями донника, клевера и вики истощало сыворотку в отношении данного штамма, но оставляло агглютинины для остальных трех

культур. Из этого можно было сделать вывод, что антигенная схема первой серологической группы клубеньковых бактерий должна быть дополнена. Кроме общих групповых антигенов a и c, приходилось допустить наличие трех дополнительных антигенов, из них одного общего для бактерий люцерны и донника, другого для люцерны и вики и третьего для люцерны и клевера.

Опыты, проведенные с остальными тремя сыворотками, показали, что бактерии люцерны полностью истощали эти сыворотки.

Сыворотка донника при обработке бактериями клевера и вики истощалась лишь в отношении этих бактерий, агглютинируя остальные три культуры. Это указывало на наличие общих антигенов, с одной стороны, для люцерны, донника и клевера и, с другой стороны, для люцерны, донника и вики.

Важно отметить, что бактерии донника истощали сыворотку в отношении своего штамма, но оставляли агглютинины для остальных культур. Это указывало на присутствие общего антигена для всех культур, который, однако, выступал лишь как антиген, «продуцирующий» антитела.

Опыты с сывороткой клевера дали аналогичные результаты: люцерна полностью истощала сыворотку, донник и вика лишали ее агглютининов лишь в отношении самих себя, наконец, гомологичная культура извлекала агглютинины для себя, оставляя антитела в отношении трех остальных культур. В отличие от других, сыворотка вики истощалась полностью не только культурой «люцерны», но и своей.

Эти данные позволяют дополнить антигенную схему (табл. 3) следующим образом (табл. 7).

Таблица 7

Антигенный комплекс клубеньковых бактерий первой серологической группы

Наименование клубеньковых бактерий	Антигены			
	термолабильные	термостабильные		дополнительные
		поверхностные	глубокие	
Люцерна . . .	a	c	b	fg
Донник	a	c	b	(f)g
Клевер	a	c	b	f(g)
Вика	a	—	b	fg

Дополнительные антигены, обозначенные в схеме f и g, проявляются как связывающие и как ведущие к продукции антител в культурах люцерны и вики.

У бактерий донника антиген f функционирует лишь как продуцирующий. То же самое следует сказать об антигене g в бактериях клевера. Этим объясняется, что каждая их этих культур истощает гомологичную сыворотку для себя, но оставляет агглютинины для остальных трех культур (в одном случае за счет антител к антигену f, в другом — за счет антител к антигену g).

Как видно из схемы для бактерий вики, антиген c отсутствует. Действительно бактерии вики не истощают сыворотки люцерны, донника и клевера в отношении этих трех культур, истощая в то же время свою сыворотку полностью. С другой стороны, сыворотка вики истощается люцерной и гомологичной культурой, но не истощается донником и клевером.

Отсутствие антигена c полностью объясняет эти данные.

Таблица 8

Данные опыта перекрестного истощения сывороток, полученных из клубеньковых бактерий второй серологической группы

Наименование клубеньковых бактерий	Сыворотка, полученная иммунизацией живыми бактериями конских бобов DEBHI. Истощается живыми бактериями			Сыворотка, полученная иммунизацией живыми бактериями фасоли DEB(H)I. Истощается живыми бактериями			Сывоортка, полученная иммунизацией живыми бактериями гороха DEBH(I). Истощается живыми бактериями		
	конских бобов debhi	фасоли deb(h)i	гороха debh(i)	конских бобов debhi	фасоли deb(h)i	гороха debh(i)	конских бобов debhi	фасоли deb(h)i	гороха debh(i)
Конские бобы	—	+	++	—	+	++	—	+	++
Фасоль	—	—	++	—	—	++	—	—	+
Горох	—	++	—	—	++	—	—	++	—

Для выяснения принадлежности дополнительных антигенов к термолабильным или термостабильным были проведены опыты адсорбции с живыми и с кипяченными культурами и с сыворотками, полученными иммунизацией кроликов живыми и кипяченными бактериями. Эти исследования показали, что дополнительные антигены относятся к стабильным и, повидимому, расположены поверхностно. Аналогичные опыты были проведены с культурами второй серологической группы (табл. 8)

Как видно, бактерии конских бобов истощали все три сыворотки. Бактерии фасоли и гороха истощали каждую из трех сывороток (в том числе и гомологичную) только в отношении себя, оставляя агглютинины для остальных двух культур.

Это позволяло построить следующую схему (табл. 9).

Таблица 9

Антигенный комплекс клубеньковых бактерий второй серологической группы

Наименование клубеньковых бактерий	Антигены			
	термолабильные	термостабильные		дополнительные
		поверхностные	глубокие	
Конские бобы	d	e	b	hi
Фасоль	d	e	b	(h)i
Горох	d	e	b	h(i)

Настоящая работа, проведенная на небольшом количестве культур, не охватывает всей антигенной структуры этой группы микробов. В дальнейших исследованиях на большом материале нам удалось провести более подробный антигенный анализ для разных представителей клубеньковых бактерий и выявить существующие взаимоотношения.

Выводы

1. Имевшиеся в нашем распоряжении клубеньковые бактерии распались на две серологические группы: первая — группа бактерий люцерны, донника, клевера, вики и вторая группа — бактерии конских бобов, фасоли и гороха.

2. Обе группы имеют общий термостабильный (глубокий) антиген.

3. Каждая серологическая группа характеризуется соответствующим ей комплексом термолабильных и термостабильных (поверхностных) антигенов.

4. Микробы, входящие в одну серологическую группу, различаются по своей антигенной характеристике, при этом некоторые антигены неполные (у бактерий донника, клевера, фасоли и гороха).

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Получено 8.XII.1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Штерн Е. А. Серологическая характеристика азотобактера. Микробиология, XVII, вып. 6, 1948.

ГРАНУЛЫ ДЛЯ АЗОТОБАКТЕРА

Н. С. Авдонин и *Ю. А. Худякова*

Вопросы использования азотогена широко освещены в литературе. Испытание его проводилось не только в лабораторных, но и в полевых условиях. В период с 1936 по 1940 г. в СССР проведено около 1500 полевых опытов с учетом эффективности азотогена в различных почвенно-климатических условиях. Результаты этих опытов оказались весьма пестрыми, и выяснить условия эффективного использования азотогена не удалось.

Изучение распространения азотобактера в природе показывает, что в кислых подзолистых почвах азотобактер не встречается. Следовательно, получить хороший эффект от применения азотогена на подзолистых почвах, при существующих способах применения, трудно или невозможно.

Причина неудач в использовании азотогена заключается в неправильном его применении.

Азотоген до настоящего времени вносился в почву так же, как нитрагин, между тем как условия существования азотобактера после его внесения в почву коренным образом отличаются от условий существования клубеньковых бактерий. Средой для клубеньковых бактерий являются корни бобовых растений, где они не только обеспечены энергетическим материалом, но и защищены от воздействия неблагоприятных внешних условий.

После внесения в почву азотобактер ожидают иные условия. В дерново-подзолистой зоне азотобактер попадает в среду с кислой реакцией, с избытком подвижных алюминия, железа, марганца, с недостатком фосфора и энергетического материала (органического вещества). В почве азотобактер встречает огромное количество микроорганизмов, более приспособленных к условиям существования в кислой среде.

Вполне естественно, что помещение азотобактера в такие условия приводит к его гибели.

В настоящее время имеется уже немало данных, указывающих на то, что устойчивость микроорганизмов в почве зависит от сосредоточенности их в виде комплексов из особей одного и того же вида. Вполне понятно, что внесенные «диффузно», распыленными в почву клетки азотобактера, попадая в неблагоприятную среду, быстро погибают.

Гибели азотобактера способствуют и методы изготовления азотогена. В настоящее время в качестве субстрата используются агаризованные среды, мел, каолин, гипс, торф и др.

Вместо подготовки клеток азотобактера к условиям существования в почве происходит его изнеживание на искусственных средах. В практике применения азотогена не учитывалось основное положение мичуринской биологии о единстве организма и среды.

Для повышения интенсивности фиксации азота атмосферы свободноживущими микроорганизмами в зоне дерново-подзолистых почв вполне возможно и целесообразно выведение новых рас азотобактера, приспособленных к условиям существования в подзолистых почвах, отбор рас из существующих в настоящее время в природе и их переделка. Наряду с этим, по нашему мнению, возможно создание условий среды, при кото-

рых существующие ныне расы азотобактера могут жить и фиксировать азот.

Последний способ имеет несколько решений. Мы использовали из них два. Первое решение заключается в создании очагов в почве, имеющих благоприятную среду для азотобактера. Второе — в подготовке азотобактера к внесению в почву, в результате чего обеспечивается приспособление его к неблагоприятным условиям среды.

Создавать благоприятные условия для жизнедеятельности азотобактера во всем пахотном слое подзолистой почвы трудно и нецелесообразно. Поэтому мы решили создать очаги в почве, в которых азотобактер имел бы все необходимое для его жизнедеятельности.

Применяемые гранулированные удобрения для этой цели непригодны, так как азотобактер в этих гранулах, даже при отношении суперфосфата к органическому веществу 1 : 20, не находит благоприятных условий, а при отношении 1 : 4 — погибает. Поэтому мы поставили перед собой задачу изготовить особые «гранулы» — очаги в почве, в которых азотобактер может жить и фиксировать азот. Первое очень важное требование азотобактера — наличие благоприятной для него реакции среды (близкой к нейтральной). Эта задача в опыте решена путем известкования почвы.

Затем к почве прибавляли перегной в отношении 1 : 1, а для удовлетворения потребностей азотобактера в фосфоре — нейтрализованный суперфосфат в дозах от 0,1 до 1,0% от веса смеси. В некоторых вариантах к смеси добавляли опилки и ржаную солому. Полученную таким образом смесь инфицировали азотогеном заводского изготовления или «почвой, обогащенной азотобактером», а затем превращали на цилиндрическом грануляторе непрерывного действия в «гранулы» размером от 0,5 до 4 см в диаметре. Для лучшего сохранения нужной реакции среды в процессе грануляции гранулы покрывались известковой оболочкой из расчета от 1 до 3% их веса. В одном из вариантов для создания оболочки использована печная зола.

Учитывая указания некоторых авторов на положительные результаты предварительного размножения азотобактера непосредственно на почве, мы провели инфицирование гранул не только заводским азотогеном, но также и «обогащенной азотобактером почвой».

Окультуренная подзолистая почва увлажнялась, заражалась водной суспензией чистой культуры Azotobacter chroococcum и выдерживалась в течение двух недель при комнатной температуре. Азотобактер, внесенный заранее в такую почву, закрепляется в ней, образуя там устойчивые комплексы, приспособляется к суровым условиям существования в почве.

Описанные здесь «гранулы» для азотобактера были изучены в 1951 г. в двух почвах без растений и в одной почве в условиях полевого опыта под растением. В опытах без растений 12 вариантов гранул разного состава были внесены в две дерновоподзолистые почвы, имеющие разную кислотность: pH = 4,6 и pH = 5,6. До внесения гранул азотбактера в этих почвах не было. В полевом опыте азотобактерные гранулы были внесены на кислой дерново-подзолистой почве под картофель. Актуальная кислотность этой почвы была pH = 4,6.

Размер делянок в опыте был равен 100 м², повторность — четырехкратная. В течение вегетационного периода проводились наблюдения над изменением реакции среды в гранулах и над развитием азотобактера. В конце вегетации учтено влияние азотогена на урожай картофеля, а также определена активность азотобактера, выделенного из гранул через 126 дней после их пребывания в кислой подзолистой почве.

Качественный анализ гранул и почвы вокруг них на присутствие азотобактера производился путем раскладывания 1 г почвы мелкими комочками по поверхности агаризованной среды Эшби. Результаты анализов

выражались в процентах комочков, давших колонии азотобактера. Интенсивность роста и пигментации отмечалась по трехбальной системе крестами.

Количественный учет азотобактера производился путем высева почвенной болтушки на среду Эшби в разведении $^1/_{10}$ и $^1/_{100}$ с микроскопическим контролем. Определение активности азотобактера производилось путем учета связанного азота по Къельдалю и остаточного сахара по Бертрану. Результаты наблюдений за азотобактером в полевом опыте даны в табл. 1.

Таблица 1

Развитие азотобактера в гранулах, внесенных в кислую дерново-подзолистую почву под картофель

(pH = 4,6)

№ варианта опыта	Схема опыта	% проросших на среде Эшби комочков почвы и интенсивность роста азотобактера			
		исходный материал 23.I	I срок 57 дней 20.VII	II срок 88 дней 20. VIII	III срок 126 дней 27. IX
1	Контроль	0	0	0	0
2	Азотоген заводской вразброс в борозду	—	0	0	3,3
3	Аммиачная селитра в дозе 45 кг на 1 га	0	0	0	0
4	Гранулы: подзол + Са + перегной + P_c 0,1% + азотоген заводской	100	100	100	100
5	Гранулы: окультуренная почва + Са + + P_c + перегной + азотоген заводской .	100	100	100	100
6	Гранулы: окультуренная почва + Са + + перегной + P_c + почва, обогащенная азотобактером	100	100	100	100
7	Масса для гранул из окультуренной почвы (вариант № 5 без грануляции) внесена в борозду	100	—	—	70

Из таблицы видно, что в кислой дерново-подзолистой почве, на которой проведен опыт, азотобактера не было. На делянках, где азотоген был внесен обычным способом, азотобактер также не прижился. Иная картина наблюдалась в азотобактерных гранулах. Во всех вариантах гранул в течение всего периода вегетации азотобактер давал обильный рост вокруг 100% комочков почвы. В варианте № 4 этого опыта для изготовления гранул использована кислая почва (pH = 4,6) с опытного участка, а в варианте № 5 использована окультуренная почва (pH = 6,6), в которой имелся азотобактер.

Из сравнения этих вариантов видно, что для изготовления азотобактерных гранул нет нужды брать окультуренные почвы, так как азотобактер хорошо сохраняется и в гранулах, изготовленных из кислых почв, нейтрализованных известью.

Существенный интерес представляет вариант 7 табл. 1, в котором смесь для изготовления азотобактерных гранул после инфицирования ее внесена в борозду в виде порошка. В период уборки картофеля (через 126 дней после закладки опыта) азотобактер вырастал вокруг 70% комочков почвы, взятой из борозды, куда была внесена такая смесь. Это показывает, что имеются возможности к сохранению азотобактера в почве и без изготовления хорошо сформированных гранул.

Частично результаты опытов, в которых гранулы находились в почве без растений, изложены в табл. 2. Во всех вариантах гранул азотобактер прекрасно сохранялся в течение всего периода наблюдений (90 дней), давая интенсивный рост и пигментацию вокруг 100% комочков почвы. На кислой дерново-подзолистой почве (pH = 4,6) азотобактер сохранялся

Таблица 2

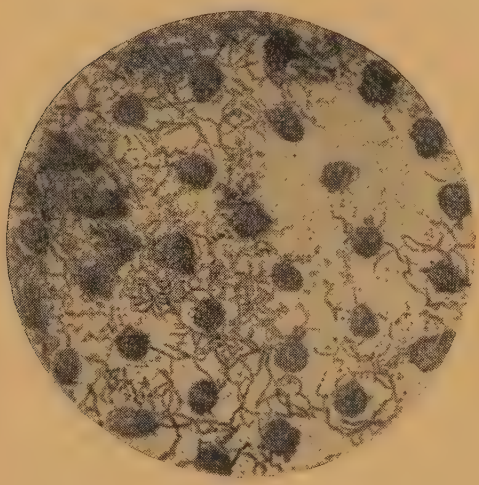
Приживаемость азотобактера в гранулах различного состава, внесенных в кислую подзолистую почву

(pH = 4,6)

№ варианта опыта	Состав гранул	% прорастания комочков почвы и интенсивность роста на среде Эшби		
		исходный материал перед формированием гранул	через 90 дней	
			гранулы	почва на расстоянии 1 см от гранул
1	Известков. почва +0,1% суперфосфата	100	96,3	0
2	„ „ +0,5% „	100	83,3	6,6
3	„ „ +1% „	100	100	0
4	„ „ +5% опилок	100	93,3	0
5	„ „ +5% соломы	100	100	0
6	„ „ +30% соломы . . .	100	93,3	6,6
7	Гранулы из окультуренной почвы . . .	100	100	6,6
8	„ с оболочкой из $CaCo_3$ 3% . .	100	93,3	3,3
9	„ с оболочкой из золы 1% . .	100	100	0
10	„ заражены почвой, обогащенной азотобактером	100	100	13,3
11	Азотоген в 20 гектарных дозах	100	66,6	0

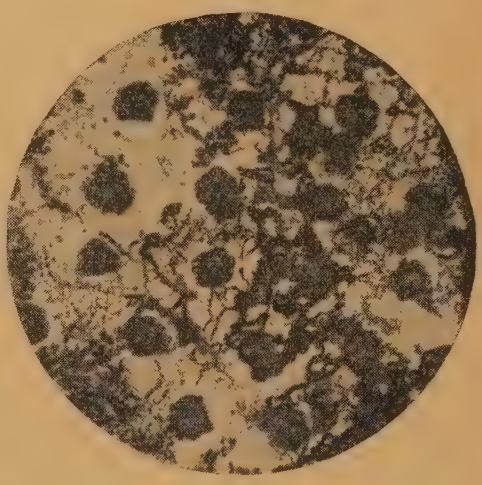
лишь внутри гранул. Проникновение его за пределы гранулы, как правило, не имело места.

Иная картина наблюдалась на умеренно кислой почве (pH = 5,6), где азотобактер прекрасно развивался не только внутри гранул, но и во всех случаях был обнаружен в большом количестве на расстоянии одного сантиметра от гранул.



1

Рис. 1. Развитие азотобактера из «гранул» с 0,1% P_2O_5



2

Рис. 2. Развитие азотобактера из «гранул» с 0,5% P_2O_5

На развитие азотобактера, интенсивность его роста и пигментации оказывают влияние содержание в гранулах фосфора, органического вещества и способ заражения их. На рис. 1—3 изображены чашки Петри с культурой азотобактера из гранул с разным количеством суперфосфата. В первый вегетационный период наилучший рост и пигментация азотобактера наблюдались в гранулах, имеющих в своем составе 0,5% супер-

фосфата. Как уменьшение количества суперфосфата до 0,1%, так увеличение его до 1% ослабляют интенсивность роста азотобактера.

Существенное влияние на развитие азотобактера в первый вегетационный период оказывает добавление органического вещества. Добавление 5% соломы стимулирует развитие азотобактера. Можно предположить, что солома частично используется азотобактером в качестве энергетического материала. Вполне возможно также, что при внесении соломы улучшается аэрация в грануле.

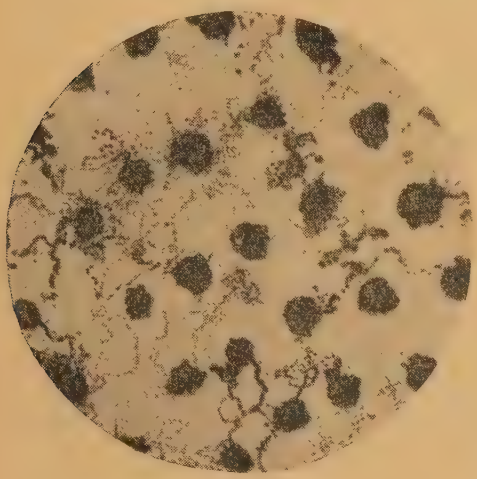
Значительное влияние на развитие азотобактера оказывает способ его подготовки перед внесением в почву. Параллельно с заводским азотогеном, вносившимся в смесь для гранул непосредственно перед их изготовлением, мы использовали почву, обогащенную азотобактером. Развитие азотобактера из гранулы, инфицированной «обогащенной азотобактером почвой», показано на рис. 4.

Подготовка азотобактера к внесению в почву улучшает его развитие в азотобактерных гранулах, находящихся в кислой подзолистой почве (рис. 1).

Одновременно с учетом наличия азотобактера, интенсивности его роста и пигментации мы производили учет его количества в гранулах различного состава в течение вегетационного периода.

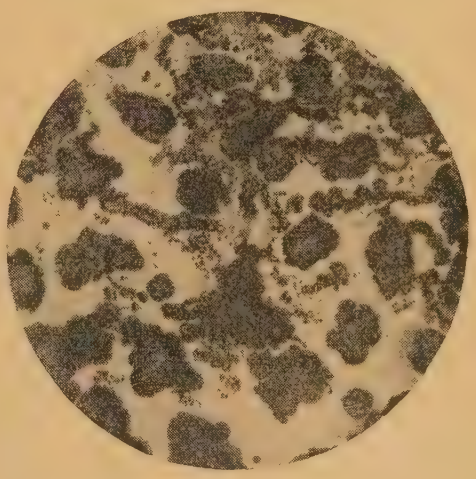
Азотобактер не только сохранялся в гранулах, но и достаточно энергично размножался. Особенно быстро увеличивалось количество клеток азотобактера в гранулах из обогащенной азотобактером почвы.

Для определения активности азотобактер был выделен из гранул, находившихся в полевом опыте под картофелем в течение 126 дней. После выращивания его на жидкой среде Эшби в течение 14 дней было определено количество связанного им азота.



3

Рис. 3. Развитие азотобактера из «гранул» с 1% P_2O_5



4

Рис. 4. Развитие азотобактера из «гранулы», инфицированной «обогащенной азотобактером» почвой

Из табл. 3 видно, что азотобактер не только жил и размножался в гранулах, находившихся 126 дней в очень кислой подзолистой почве, но и сохранил довольно высокую интенсивность фиксации азота.

Исследования показали, что реакция среды внутри азотобактерных гранул оказалась весьма устойчивой, особенно в гранулах, покрытых оболочкой извести из расчета 3% от их веса. Через 90 дней реакция среды

Таблица 3

Активность азотобактера, выделенного из гранул после нахождения их в дерново-подзолистой почве в течение 126 дней

(pH = 4,6)

Гранулы, из которых выделен азотобактер	Фиксировано азота атмосферы на 1 г сахара в мг
Из кислой подзолистой почвы, зараженной азотогеном	4,5
Из окультуренной почвы, зараженной азотогеном	4,8
Из почвы, предварительно обогащенной азотобактером	4,76

в этих гранулах сохранилась на уровне pH = 7,2 против pH = 4,6 в окружающей их почве.

В полевом опыте, где азотобактерные гранулы находились в сильнокислой подзолистой почве (pH = 4,6) 126 дней, реакция среды в них сохранилась в пределах pH = 6,4—6,6.

Азотобактерные «гранулы» оказались весьма буферными, что весьма важно для жизнедеятельности азотобактера.

Кроме того, гранулы подвергались анализу на содержание P_2O_5 в вытяжке, сделанной при помощи 0,5 N уксусной кислоты. Содержание P_2O_5 в гранулах в течение вегетационного периода колебалось в пределах 0,25—0,40%. Такое количество фосфора, повидимому, вполне достаточно для азотобактера.

Окончательная оценка агротехнических приемов и любого удобрения производится, как известно, по их влиянию на рост и урожай растений. С этой целью в полевом опыте с внесением азотобактерных гранул под картофель были взяты пробы растений (17 августа) и произведен учет урожая (27 сентября).

К 17 августа вес надземной массы картофеля, где были внесены азотобактерные гранулы, превосходил его на контрольных делянках на 17—30%. Особенно благоприятное действие азотобактерные гранулы оказали на рост клубней картофеля. Вес клубней картофеля из почвы с азатобактерными гранулами равнялся их весу из почвы с внесением аммиачной

Таблица 4

Влияние азотобактерных гранул на урожай картофеля

(Результаты полевого опыта 1951 г. на дерново-подзолистой почве с pH = 4,6)

№ варианта опыта	Схема опыта	Урожай клубней картофеля в ц/га	Прибавка урожая	
			в ц/га	в %
1	Контроль	160,6	—	—
2	Аммиачная селитра в дозе 45 кг/га . . .	215,5	44,9	34,1
3	Азотоген внесен без гранул	165,1	4,5	2,8
4	Гранулы из кислой почвы, зараженной азотогеном	198,4	37,8	23,9
5	Гранулы из окультуренной почвы, зараженной азотогеном	194,6	34,0	21,2
6	Гранулы из почвы, обогащенной азотобактером	198,7	33,1	23,7
7	Масса для гранул в борозду (вариант № 5) в негранулированном виде	183,1	22,5	14,0

селитры в дозе 45 кг/га азота. Между тем внесение азотогена обычным способом никакого влияния на рост картофеля не оказало.

Под влиянием азотобактерных гранул содержание азота в листьях картофеля возрастало на 0,15—0,34%. На вариантах с азотобактерными гранулами листья картофеля имели более зеленую окраску, чем листья на контрольном варианте.

Данные (табл. 4) показывают, что азотобактерные гранулы повысили урожай картофеля на 34—38 ц/га, или на 21—24%. Если принять во внимание то, что почва под опытом отличалась слабой окультуренностью и высокой кислотностью, а погодные условия 1951 г. для урожая картофеля были неблагоприятными, то прибавку урожая в 34—38 ц/га нужно считать высокой. Внесение азотогена обычным способом прибавки урожая не дало, так как прибавка в 4,5 ц/га находится в пределах ошибки полевого опыта. Заслуживает внимания сравнение эффективности азотобактерных гранул с эффективностью такого же количества зараженной азотогеном массы, внесенной в негранулированном виде (табл. 4). Повышение урожайности в этом варианте составило 22,5 ц/га, или 14% против 38 ц/га, или 24%, полученных от такого же количества массы, внесенной в гранулированной форме.

Отмеченная разница объясняется главным образом тем, что при внесении содержимого азотобактерных гранул в порошке условия для жизни азотобактера были менее благоприятными, чем при внесении его в виде гранул. Это подтверждается и данными табл. 1, из которой видно, что азотобактер при внесении содержимого азотобактерных гранул в борозду в порошке развивался слабее, чем при внесении в виде гранул.

Таким образом, азотоген, внесенный в особых азотобактерных гранулах на кислых подзолистых почвах, существенно повышает урожай растений. Мы далеки от мысли, что изложенными здесь опытами проблема эффективного использования азотогена на кислых дерново-подзолистых почвах решена окончательно. Однако наш материал показывает, что применявшиеся до сих пор способы использования азотогена непригодны. Данные исследования показали, что при помощи доступных колхозам и совхозам средств можно создать в почве для азотобактера такие условия, при которых он будет эффективным и в зоне кислых дерново-подзолистых почв.

Есть основания предполагать, что изложенные в настоящей работе соображения об условиях эффективного использования азотогена в принципе применимы не только для подзолистых, но и для других почв. На черноземе, например, не потребуется устранения кислой реакции, но очаговое внесение фосфора и органического вещества, а также предварительное размножение азотобактера в почве там будут полезны.

Выводы

1. Азотоген не эффективен на кислых дерново-подзолистых почвах при существующих способах его применения, так как он попадает в кислую среду с недостатком фосфора и органического вещества, с избытком подвижных форм алюминия, с наличием конкурентов азотобактера, приспособленных к условиям подзолистых почв. Гибели азотобактера способствует также внесение его в распыленном виде после содержания на искусственных средах.

2. Для успешного применения азотогена, наряду с выведением устойчивых рас азотобактера, необходимо создавать благоприятные условия существования для него в почве, а также изменять способы его внесения в почву.

3. Предложены особые «азотобактерные гранулы», представляющие собой очаги с благоприятными для азотобактера условиями существования.

4. При внесении азотогена в виде особых гранул азотобактер жил, размножался и фиксировал азот в кислой дерново-подзолистой почве в течение всего вегетационного периода, в то время как при внесении его по старому способу он погибал.

5. Весьма важным свойством гранул для азотобактера является их буферность, которая достигалась путем включения в гранулы нейтрализованной почвы и создания вокруг них известковой оболочки. При этом реакция среды в гранулах сохранялась в течение всего периода вегетации на уровне pH = 6,2—6,8.

6. Предварительное размножение азотобактера на окультуренной почве со слабокислой или нейтральной реакцией среды повышает устойчивость азотобактера против неблагоприятных условий его существования в последующее время.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Агробиостанция
биолого-почвенного факультета

Получено 22.III.1952 г.

НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ В ПОЧВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ ХОЛОДНОГО

А. В. Рыбалкина и *Е. В. Кононенко*

Умение управлять биологическими процессами, протекающими в почве, неразрывно связано с изучением микрофлоры непосредственно в самой почве. Предложенный Виноградским в 1925 г. [1] метод непосредственного изучения микроорганизмов в почве достаточно широко вошел в почвенную микробиологию как метод количественного учета. Однако необходимо отметить, что при пользовании этим методом может иметь место преувеличение данных за счет подсчитываемых мертвых клеток, кроме того, в процессе приготовления препаратов, при многократном встряхивании почвы с водой, грибные и актиномицетные гифы (особенно в период фрагментации) могут расчленяться на множество мелких отдельностей. Метод Виноградского не дает представления о естественных группировках микроорганизмов и их взаимоотношениях в естественном состоянии, а скорее создает представление о микрофлоре почвы как о «разнородной смеси зародышей». В развитие того же принципа непосредственного наблюдения микрофлоры в почве были проведены работы Холодного [4, 5]. Метод стекол обрастания по Холодному дает картину почвенных микроорганизмов на поверхности стекла, покрытого пленкой почвенного раствора. Он позволяет производить изучение микроорганизмов в почве с ненарушенной структурой, выявлять соотношения и взаимоотношения отдельных групп в ней, создает представление о «микробном ландшафте» данной почвы.

Недостатком этой методики является невозможность изолирования отдельных форм для их дальнейшего изучения. Последующие работы представляют собой вариации метода Холодного в лабораторных условиях. Так, Крючкова [2], изучая влияние удобрений на развитие микрофлоры в почве, заливала обросшие стекла различными средами с тем, чтобы иметь возможность выявить отдельные физиологические группы микроорганизмов, т. е. сочетала метод непосредственного наблюдения с методом элективных сред классической микробиологии.

Заменцкая [6] использовала метод Холодного для выявления специфических микроорганизмов, разлагающих различные сложные органические вещества, внесенные в почву. Виноградский [1] считает, что метод Холодного дает картину развития микрофлоры почвы только в определенном ее участке: почва, по Виноградскому, «представляет собой мозаику, где остатки разнородных веществ животного и растительного происхождения окружены вызванными ими к жизни микроорганизмами». Обобщение же о микрофлоре возможно только на основании средней пробы почвы. Это положение Виноградского едва ли можно считать основательным, так как по учению Докучаева — Костычева — Вильямса почву нельзя себе представить без животных и растительных остатков, поэтому при микробиологических, так же как и при почвенных, исследованиях, во избежание случайности следует пользоваться типичным для данной почвы участком, и в этом случае микробиологу необходимо работать в тесном комплексе с почвоведом. Кроме того, при работе только с верхними горизонтами почвы простота постановки стекол по Холодному может быть использована для большого количества повторностей.

При изучении микрофлоры южных черноземов мы начали наши исследования методом обрастания стекол по Холодному, но вскоре убедились в необходимости видоизменить его потому, что обрастание начиналось только через две-три недели, а в некоторых случаях, например при низкой влажности почв в 1951 г., обрастание стекол за этот срок вообще не происходило.

Предметом настоящей работы является изложение видоизменения метода Холодного и описание ассоциаций микроорганизмов и их морфологии, наблюдаемых нами при использовании этой методики.

Методика

Видоизменение методики Холодного заключалось в том, что применялись предметные стекла, покрытые тонкой пленкой агаризованной среды. Вначале для сравнения были взяты крахмально-аммиачный, мясо-пептонный, Эшби-агар и водопроводная вода с 2% агар-агара. Так как отдельные ингредиенты среды, а главное агар-агар содержат большое количество мертвых бактериальных тел, от них следует освободиться обработкой приготовленной среды белком куриного яйца по методике, описанной Омелянским [3].

Методика приготовления стекол заключается в том, что стерильное предметное стекло держат пинцетом в наклонном положении, заливают из пипетки агаризованной средой, избытку агара дают стечь, затем стекла помещают в большие чашки Петри и подсушивают в стерильных условиях при 35—45°. На высушенных стеклах остается от 3 до 5 мг среды. Для заготовления впрок стекла складывают попарно агаризованными поверхностями внутрь и завертывают в стерильную бумагу. Такие стекла мы употребляли в течение двух месяцев работы в условиях экспедиции.

При постановке опытов стекла закладывались в различные горизонты почвенного профиля. Для этого на гладкой стенке разреза на нужной глубине приготовляется сначала ниша; в стенке ниши стерильной стамеской пробивается щель, в которую вставляется стекло, которое агаризованной поверхностью прижимается к почве, к другой стороне стекла стамеской же прижимается почва. После постановки стекол ниша снова закладывается вынутой из нее почвой. В наших опытах стекла закладывались на разные сроки от 2 до 18 дней.

При снятии опытов стекла из почвы следует вынимать осторожно, чтобы не повредить набухшего агара. Вынутые стекла быстро высыхают на воздухе, их фиксируют и окрашивают 1%-ным раствором карболового эритрозина в течение часа. В случае высокой влажности почв, особенно тяжелого механического состава, чтобы избежать отставания агара от стекла, мы применяли обвертывание стекол марлей. Марля прореживается в два раза, кипятится в дестиллированной воде, которая сменяется четыре-пять раз, высушивается и стерилизуется в автоклаве.

Наблюдая обрастание стекол, покрытых различными питательными средами, а также стекол по Холодному, мы обнаружили следующие явления.

В опытах с южными черноземами летом 1951 г. и 1952 г. мы не получали обрастания стекол по Холодному в течение двух недель. Стекла же, покрытые питательными средами, всегда обрастали. Лучшее обрастание наших стекол происходит возможно потому, что высушенная агазированная среда, активно впитывая в себя окружающий почвенный раствор, создает возможность для более быстрого развития микроорганизмов по сравнению с пустыми стеклами, которые, очевидно, не могут обрастать в короткий срок, особенно в условиях низкой влажности. Кроме того, внесенная со стеклом питательная среда служит как бы приманкой, особенно в начале обрастания стекол.

Характер обрастания стекол, покрытых разными питательными средами, был сходным; различия выражались лишь в количествах биомассы микроорганизмов, например в различной величине колоний одной и той же формы бактерий, количестве, длине и толщине гиф у грибов и пр.

Следует учитывать также то обстоятельство, что в условиях почвы продукты метаболизма микроорганизмов и продукты изменения питательной среды не накапливались, как это бывает при обычном посеве на чашках, а имели отток и тем самым не оказывали решающего влияния на развитие микрофлоры.

Состав внесенных питательных сред в наших опытах не имел селективного значения еще и потому, что количество их было ничтожно мало по сравнению с окружающей почвой. При обычных микробиологических методах имеет место обратное соотношение в количествах питательной среды и высеваемой на них почвы.

В наших опытах мы решили остановиться на крахмально-аммиачном агаре, так как на агаризованной воде развитие шло несколько медленнее, а на мясо-пептонной среде зарастание было слишком бурным, что мешало наблюдению за отдельными группами организмов.

Характер обрастания стекол

При исследовании стекол различных сроков обрастания и при различных условиях температуры и влажности мы никогда не наблюдали беспорядочного расположения отдельных единичных особей в смеси разных форм. Даже при кратковременном пребывании стекла в почве, например в течение двух дней, организмы образовывали либо колонии, либо скопления.

Под колонией мы понимаем бактериальное образование, имеющее определенную форму с хорошо обозначенными границами и характерным расположением отдельных клеток внутри них. Бактериальные колонии состоят из какой-нибудь одной обособленной группы. Скопление не имеет ясно выраженной границы, и клетки внутри него могут располагаться и в определенном порядке и без порядка. Скопления не всегда состоят из одной формы, нередко среди одних форм встречаются участки, занятые другой формой.

Бактериальные колонии на стеклах правильнее называть микроколониями, в отличие от колоний, вырастающих на чашках Петри. Многие бактериальные колонии на стеклах помещаются целиком в поле зрения иммерсионной системы и клетки в них часто располагаются в один слой. Имеются колонии и большего размера, но и они видимы только под микроскопом. Скопления отличаются от колоний не только отсутствием формы, но главным образом размерами: они могут состоять всего из нескольких клеток или же занимать несколько полей зрения. Одни и те же организмы при различных условиях могут давать и колонии и скопления.

Формы колоний бактерий бывают самые разнообразные. Они различаются по величине, характеру края, плотности клеток внутри колонии, расположению клеток в один или несколько слоев, а также по расположению клеток относительно друг друга. Эти признаки дают возможность классифицировать разные типы организмов, так, например, легко узнать рост организмов типа Bac. mycoides (рис. 1), Bac. megatherium (рис. 2), миксобактерий (рис. 3) и других.

Палочки различаются по форме и величине, а некоторые из них настолько характерны, что могут служить для классификации организмов, например клостридиальные, плектридиальные, Bac. megatherium, миксобактерии и другие. Наряду с различными формами палочек на стеклах часто вырастают кокки, коккобациллы, а также особые очень мелкие

контурно слабо окрашенные организмы, которые мы условно называем «тельца».

Споры всегда появляются в клетках, расположенных в центральной части, и постепенно распространяются к периферии колонии. По окончании спорообразования первоначальный порядок в расположении спор быстро утрачивается, они лежат в беспорядочном скоплении и постепенно исчезают со стекла. В некоторые периоды на стеклах в большом количестве встречаются огромные скопления бактерий в зооглеях. Капсульные палочки встречаются как единичные среди скоплений неспоровых форм.

Грибы и актиномицеты также имеют различные формы роста; вначале это микроколонии, состоящие из небольшого числа коротких радиально расположенных гиф, а затем гифы постепенно разрастаются по всему препарату, ветвятся и переплетаются между собой и с другими гифами, образуя сетку мицелия.

Мы имели возможность наблюдать не только различные формы роста и стадии развития актиномицетов, но и некоторую периодичность в смене стадий развития. В зависимости от условий в почве в данный период времени часть гиф мицелия как боковых, так и основных образует спирали, вслед за этим начинается фрагментация гиф боковых и воздушного мицелия. При некоторых условиях фрагментацией охватывается весь мицелий; вслед за этим наступает частичный и значительно реже полный распад мицелия на споры. Так, например, на стеклах, заложенных в разрез застепненной залежи в верхнюю часть гумусового горизонта (5—6 см), мы получили в течение 12 дней два цикла в развитии актиномицетов от микроколоний до полного распада на споры.

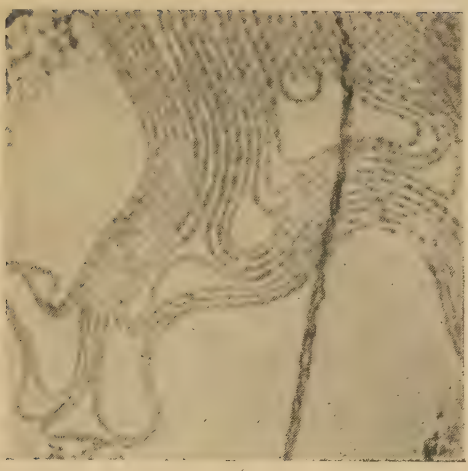
В единичных случаях мы наблюдали очень интересные явления, когда отдельные гифы актиномицетов собирались в различные по величине тяжи. Эти тяжи могут образовывать спирали и четкообразные вздутия разных размеров (рис. 4).

Спорообразование у грибов наблюдается не при всяких условиях. Чаще всего в южных черноземах мы отмечали спорообразование у форм, напоминающих тип Penicillium, и у нескольких типов Mucor, реже Fusarium (рис. 5) и еще пяти неизвестных нам форм. Встречается различный мицелий, обладающий способностью давать образования типа оидий (рис. 6). Гифы мицелия очень разнообразны по величине, содержимому и способности окрашиваться. Иногда гифы грибов могут собираться в тяжи. В условиях пониженной влажности форма гиф становится необычной. Отдельные клетки гиф сильно разрастаются и делятся в различных направлениях, образуя как бы ткань. Содержимое таких гиф также резко отличается от «нормальных». В клетках гиф наблюдается уплотнение плазмы, красящееся от интенсивно красного до красно-бурого цвета; между уплотненными участками плазмы располагаются в разном количестве и различные по форме и величине образования, напоминающие вакуоли (рис. 7).

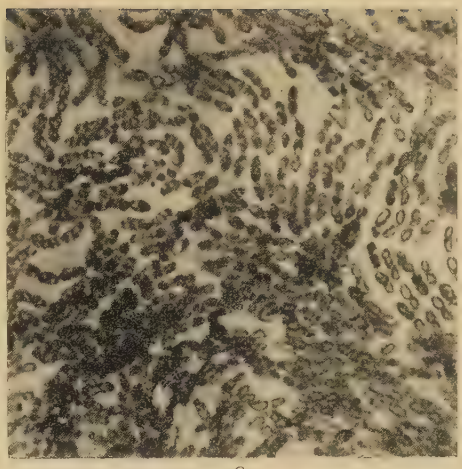
Описанные выше изменения распространяются и на органы плодоношения; при этом наблюдается отшнуровывание непосредственно от разросшейся ткани образований, которые напоминают споры.

На стеклах мы часто наблюдали организмы, по своей форме, размерам и строению клеток сходные с дрожжами. По морфологии эти организмы можно разделить на несколько типов; круглые, овальные, мелкие типа Torula и более крупные, а также мицелиальные формы (рис. 8). Дрожжеподобные организмы в больших количествах встречались в почве под лесной растительностью в засушливый период, в малых количествах они встречаются почти всегда.

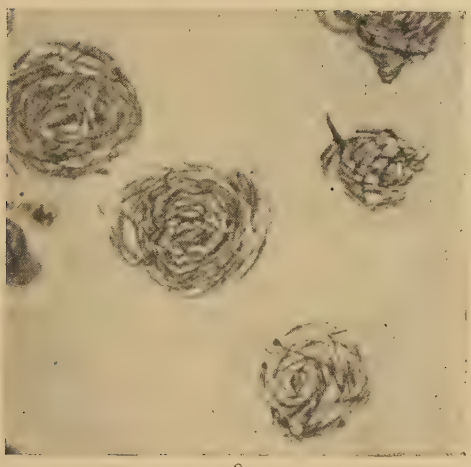
Колонии всех микроорганизмов чаще всего располагаются либо возле почвенных частиц и минералов, либо на них (рис. 9). При развитии колониями организмы бывают обособлены друг от друга и лишь гифы мице-



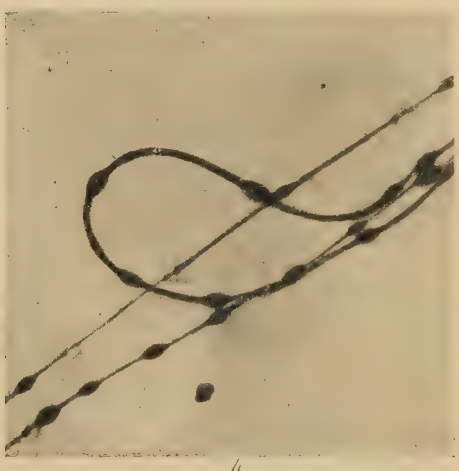
1



2

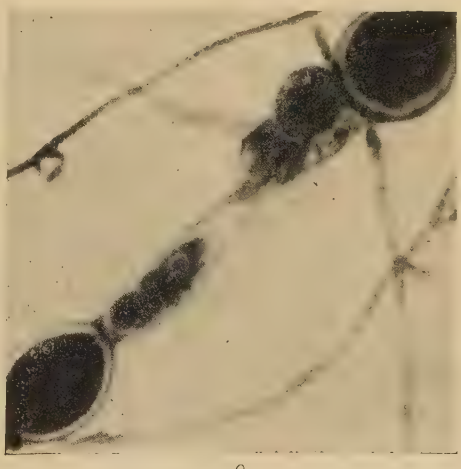


3



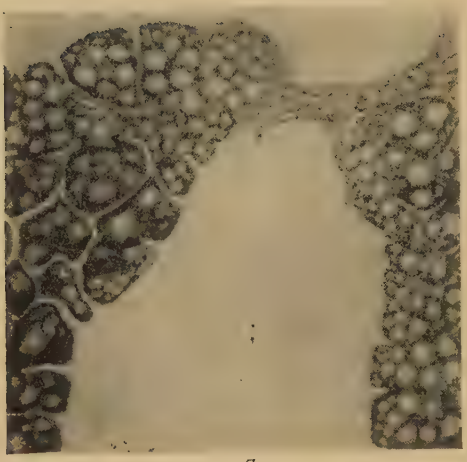
4

5

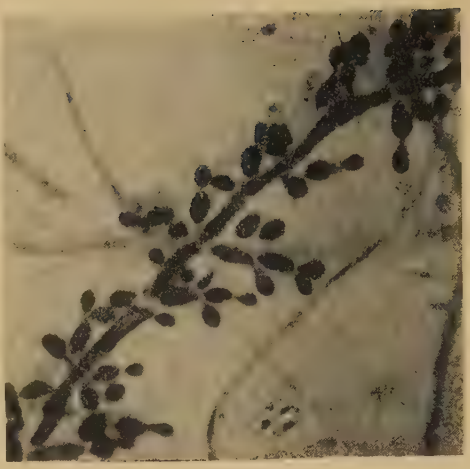


6

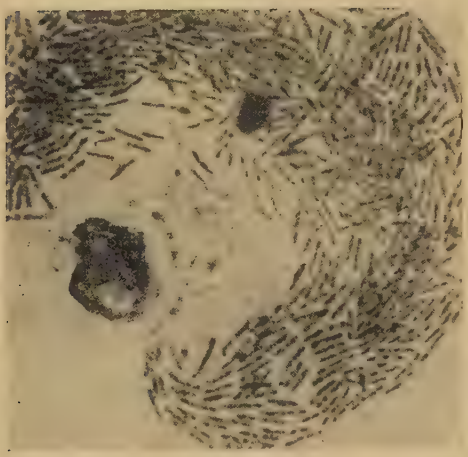
Рис. 1. Край микроколонии типа Bac. mycoides. (Ув. × 1100)
Рис. 2. Палочки типа Bac. megatherium. (Ув. × 1200)
Рис. 3. Микроколонии типа миксобактерий. (Ув. × 1100)
Рис. 4. Четки на тяжах актиномицета. (Ув. × 1100)
Рис. 5. Споры типа Fusarium. (Ув. × 1100)
Рис. 6. Образования типа оидий. (Ув. × 1100)



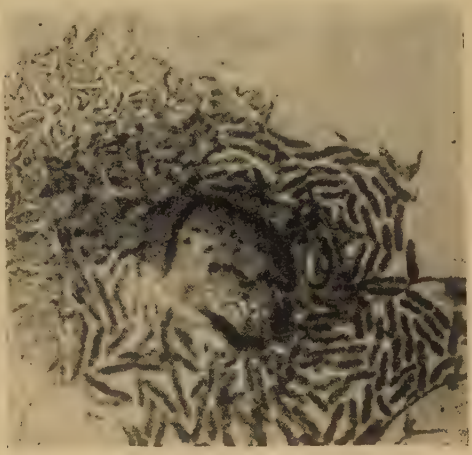
7



8



9



10

11

Рис. 7. } Дрожжеподобные организмы. (Ув. × 1100)
Рис. 8. }
Рис. 9. Расположение микроколоний возле почвенных частиц. (Ув. × 1100)
Рис. 10. Развитие микроколоний двух палочек в непосредственной близости. (Ув. × 1100)
Рис. 11. Разрушение гиф актиномицета бактериями. (Ув. × 1100)

лиальных форм свободно пронизывают микроколонии. Колонии однородных организмов большей частью располагаются неподалеку друг от друга, и часто на одной половине стекла наблюдается преобладание одной формы, а на другой части — другой формы.

В препаратах встречаются и единичные, не развивающиеся клетки, но их роль и по массе и по процессам метаболизма должна быть незначительна по сравнению с массой развившихся организмов; такие отдельные клетки мы во внимание не принимаем, так как они могут быть мертвыми или же находящимися в данный момент в подавленном состоянии.

Обрастание препаратов никогда не бывает равномерным по всей поверхности. На ранних стадиях обрастания стекол видно, что микроорганизмы начинают селиться участками, которые и в дальнейшем остаются более обросшими частями препаратов.

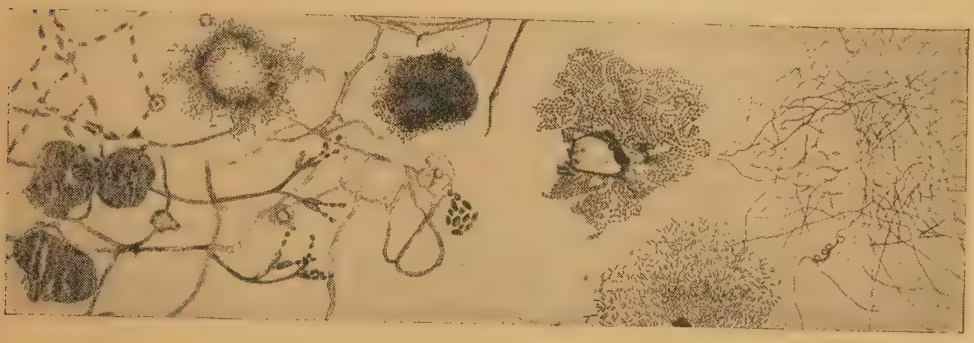


Рис. 12. Картина обрастания препарата. Монтаж по фотографиям. (Ув. × ~ 400)

Взаимоотношения колоний и скоплений разных микроорганизмов могут быть разными. В одних случаях они развиваются в непосредственной близости друг от друга, что мы чаще всего наблюдали при низкой влажности почвы (рис. 10). Нами наблюдались случаи одновременного развития крупных форм типа споровых палочек, дрожжей и других и мелких — типа неспоровых палочек. Часто наблюдалось, что мелкие формы располагались возле крупных, окружая их.

При повышенной влажности отчетливо видны проявления антагонистических свойств организмов. На препаратах бывает хорошо видно постепенное разрушение гиф грибов и реже актиномицетов до полного их растворения, когда по отдельным остаткам гиф и ходу бактерий можно судить о бывших здесь ранее гифах (рис. 11).

Таким образом, изучение одного препарата дает возможность наблюдать одновременное развитие разнообразных микроорганизмов, их состояние, соотношение отдельных форм и их взаимоотношения. Это иллюстрируется на рис. 12, который представляет собой монтаж различных форм из одного препарата. В зависимости от метеорологических условий во время опыта количество, состав и соотношения вырастающих на стеклах форм меняются.

Для перехода к выделению в культуры микроорганизмов со стекол мы применяли проращивание препаратов в термостате в стерильных чашках Коха и получили те же группы микроорганизмов, что и в препаратах, только что вынутых из почвы, но значительно более разросшиеся.

Так как подсчет микроорганизмов на наших препаратах затруднен, потому что отдельные клетки в колониях, а также мицелиальные формы просчитать невозможно, мы временно вводим для своих исследований термин «степень обрастания».

При описании препаратов мы отмечаем три степени обрастания: слабое, хорошее и среднее. Слабое обрастание — когда на стеклах в немно-

гих местах наблюдаются отдельные очаги слабо развитых микроорганизмов, грибы и актиномицеты встречаются в виде коротких гиф, а бактерии либо мелкими скоплениями, либо только начинающими развиваться микроколониями. Хорошее — когда по всему стеклу, часто на очень близком расстоянии друг от друга располагаются хорошо развившиеся группы разных организмов в виде микроколоний и скоплений, а мицелиальные формы еще и в виде сетки мицелия. Среднее обрастание — в том случае, если рост микроорганизмов очаговый, большие бактериальные скопления и многочисленные колонии отсутствуют, а мицелиальные формы остаются в пределах микроколоний, не образуя сетки мицелия. Предварительную оценку интенсивности обрастания следует производить с малым увеличением микроскопа, детальный просмотр препарата производится с большим увеличением.

При составлении характеристики препаратов мы различаем следующие группы: 1) грибы; 2) актиномицеты; 3) дрожжеподобные организмы; 4) споровые и 5) неспоровые бактерии. Внутри каждой группы учитывались все легко различающиеся по плодоношению и форме микроорганизмы: разные виды грибов, клостридиальные, плектридиальные и миксобактерии, а также «тельца» и др.

Материалы по изучению микрофлоры южных черноземов описанным методом будут изложены в особом сообщении.

Выводы

1. Стекла, покрытые агаризованной питательной средой, можно применять в более разнообразных условиях сравнительно с обычными пустыми стеклами обрастания. Обрастание этих стекол происходит за более короткий срок пребывания их в почве.

2. Применение агаризованных стекол позволяет наблюдать на одном стекле комплекс микроорганизмов, находящихся в деятельном состоянии в почве в данный отрезок времени, а также соотношения и взаимоотношения между отдельными представителями этого комплекса.

3. Изучение стекол обрастания показало, что на препаратах нет случайной беспорядочной смеси отдельных особей микроорганизмов, а каждая форма развивается самостоятельно. Степень распространения каждой отдельной формы на стекле зависит от комплекса условий в почве в данный момент (количество органического вещества, плотность населения, температура, pH, влажность и др.).

4. Наблюдение на агаризованных стеклах позволяет ближе подойти к изучению морфологии микроорганизмов в их естественном местообитании, т. е. в почве.

5. Хорошо выраженные морфологические отклонения организмов следует рассматривать как реакцию на изменение внешних условий (например, разрастание гиф гриба при пониженной влажности).

Почвенный институт им. В. В. Докучаева
Академии наук СССР
Москва

Получено 2.VI.1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградский С. Н. Методы почвенной микробиологии, ч. VI, стр. 387. Микробиология почвы. Изд-во АН СССР, М., 1952.
2. Крючкова А. П. К изучению экологической изменчивости микроорганизмов в связи с агрономической диагностикой. Микробиология, III, вып. 2, 1934.
3. Омелянский В. Л. Практическое руководство по микробиологии. Изд-во АН СССР, М. стр. 49, 1940.
4. Холодный Н. Г. (Cholodny N. G.). Ueber eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. Arch. Mikrobiol., 1, 1930.
5. Холодный Н. Г. Методы непосредственного наблюдения почвенной микрофлоры. Микробиология, IV, вып. 2, 1935.
6. Ziemiecka J. The use of a modified Rossi-Cholodny technic for studying the organisms that decompose certain organic compounds in soil. Ztbl. Bakt., Abt. II, 91, 379, 1934/35.

О ВЫЖИВАЕМОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЛЕЧЕБНЫХ ГРЯЗЯХ

Н. П. Крючкова

Определением сроков выживаемости микроорганизмов в лечебных грязях занимались многие авторы. В литературе освещен ряд исследований, проведенных на различных грязевых озерах. Этими исследованиями установлены различные сроки выживаемости в лечебных грязях для одного и того же вида микроорганизма.

Исследования Иванова [5] проводились на Старорусской лечебной грязи в 1912 г. Вопрос о влиянии Старорусской лечебной грязи на болезнетворные микроорганизмы им был разделен на две части: 1) влияние химических агентов грязи и 2) влияние разнообразной микрофлоры, населяющей лечебную грязь.

Для решения вопроса о влиянии химических агентов автор вносил бактерии в стерильную грязь.

В результате проведенных опытов сроки выживания в стерильной грязи были в днях таковы: для Streptococcus — 34, Staphylococcus — 262, Bact. pyocyaneum — 409; брюшно-тифозной палочки — 218, холерного вибриона — 250.

При внесении Bac. pyocyaneum в нестерильную грязь срок выживания удлиняется до 409 дней.

В работе Свешниковой [7] отмечено, что Staphylococcus в нестерильной грязи погибал через 99 суток.

Автор приходит к выводу, что внесенные в нестерилизованную грязь бактерии погибают скорее, чем в стерилизованной, и объясняет это межвидовой борьбой.

Исследования Рубенчика, Гойхерман и Райх [6] проводились в 1932 г. на рапе и грязи Одесских лиманов. Сроки выживаемости внесенных бактерий авторами устанавливаются в днях следующие: для Staphylococcus — 48, Bact. pyocyaneum — 48, Bact. coli — 43. Разницы в сроках выживаемости в стерильной и нестерильной грязи не было.

В этой же работе авторы отмечают, что при условии аэрации и освещения, при повышении концентрации рапы и температуры, при добавлении органического вещества, при уменьшении количества посевного материала выживаемость патогенных бактерий в лечебных грязях снижалась.

Опыты, проведенные по изучению сроков выживаемости патогенных бактерий в грязи Сакского озера, освещены в работе Азбелева, Игнатович и Богатой [1]. Указанные авторы делают следующие выводы.

1. Сроки выживаемости патогенных бактерий с повышением температуры сокращаются, а с повышением концентрации до 25° Bé увеличиваются.

2. Вирулентность микробов паратифозной группы в течение 97 дней сохраняется полностью.

3. Неблагоприятным фактором для жизни патогенных бактерий является высокая концентрация солей в грязи.

Волкова [2], изучая выживаемость патогенных микроорганизмов в грязи Тамбуканского озера, приходит к выводу, что Тамбуканская грязь не бактерицидна. В дальнейшем автор предполагает, что грязь (как солевая среда) содержит разнообразные органические компоненты, газообразные продукты, различные сульфиды, большое количество собственных микроорганизмов и что в грязи могут проявляться по отношению к чуждым патогенным бактериям антагонистические бактерицидные и литические свойства.

Исследования Волковой и Балабановой [4] были направлены на изучение бактерицидных свойств грязи Тамбуканского озера. На основании проведенных экспериментов авторы приходят к выводу, что бактерицидное действие грязи распространяется почти в одинаковой мере как на грамположительные, так и на грамотрицательные виды патогенных и условнопатогенных микробов.

В работе 1949 г. Волкова [3] ставила задачей разрешение создавшихся противоречий в области оценки лечебных грязей, с одной стороны, как фактора бактерицидного, и с другой,— представляющего среду, в которой длительно выживают патогенные бактерии. В результате работы была установлена зависимость выживаемости условнопатогенных бактерий от ряда условий: температуры, количества внесенного материала и добавления органического вещества. Причиной быстрой гибели патогенных бактерий в грязи автор считает антагонизм сапрофитной грязевой микрофлоры и антибиотическое действие химических продуктов ее жизнедеятельности.

В рассмотренных работах сроки выживаемости патогенных бактерий в лечебных грязях резко колебались.

Нами, сотрудниками физико-химической и микробиологической лаборатории Центрального института курортологии под руководством Бунеева и Рудакова, на основании выводов, полученных в результате работ по регенерации отработанной грязи, проводившихся в 1948—1949 гг., установлено, что биологическое состояние нагретой, активированной, отработанной грязи существенно отличается от состояния натуральной озерной грязи и в связи с этим следует ожидать, что сроки выживания патогенной микрофлоры окажутся совершенно иными для отработанной грязи, чем для натуральной озерной.

Наши опыты в 1948 г. по регенерации отработанной грязи проводились на Сакской грязи. Образцы Сакской грязи, взятые для опытов, были различны по физико-химическим и микробиологическим характеристикам.

При изучении скорости и направления биологических процессов в отработанной грязи во время ее регенерации удалось установить, что процессы регенерации грязи Сакского озера могут идти двумя различными путями, зависящими от физико-химических и микробиологических свойств грязи.

Первый путь — это постепенное накопление сероводорода при довольно интенсивном развитии десульфурирующих бактерий с первых же дней хранения прогретой грязи. Этот путь выявился при регенерации Сакской грязи, взятой из-под гипсовой корки и обладающей следующими свойствами: повышенной соленостью (16,5° Bé), малым количеством органических веществ, небольшим количеством аэробных бактерий и полным отсутствием анаэробных гнилостных микроорганизмов. Результаты опыта изложены в табл. 1.

Таблица 1

Изменения количества микроорганизмов при регенерации отработанной Сакской грязи высокой солености (16,5° Bé)

Дата	Дни от начала опыта	Количество бактерий в 1 г сырой грязи		Развитие десульфурирующих бактерий—почернение осадка в среде Таусона в сутках
		аэробы на МПА в тыс.	анаэробы на среде Вильсон-Блера	
14.VII	0	510	Роста не было	5
18.VII	5	371		5
23.VII	9	680		2
28.VIII	44	20		3

Второй путь наметился при регенерации Сакской грязи, взятой с участков, не покрытых гипсовой коркой. Эта грязь была пониженной солености (11° Bé), с бóльшим количеством органических веществ и с бóльшим количеством аэробных бактерий по отношению к грязи, взятой из-под гипсовой корки. Кроме того, в этой грязи присутствовали анаэробные — гнилостные микроорганизмы. Этот путь характеризуется наличием «гнилостной» стадии как первой стадии процесса регенерации, которая продолжалась с первых дней опыта в течение двух недель. Эта стадия характеризовалась увеличением общего количества аэробных и анаэробных гнилостных микроорганизмов, а также резким снижением pH и окислительно-восстановительного потенциала в грязи (определения К. А. Овсянниковой). За «гнилостной» стадией следовала стадия постепенного накопления сероводорода, при резком увеличении активности десульфурирующей микрофлоры. Результаты опыта представлены в табл. 2.

Таблица 2

Изменения количества микроорганизмов при регенерации отработанной Сакской грязи пониженной солености (11° Bé)

Дата	Дни от начала опыта	Количество бактерий в 1 г сырой грязи		Развитие десульфурирующих бактерий — почернение осадка в среде Туасона в сутках	Примечание
		аэробы на МПА в тыс.	анаэробы на среде Вильсон-Блера		
18.VI	0	140	320	4	Качественная проба на NH_3 при развитии аэробных бактерий всегда была положительной
22.VI	4	160	370	5	
25.VI	7	170	350	5	
28.VI	10	1200	750	6	
1.VII	13	220	480	5	
6.VII	18	700	40	4	
10.VII	22	340	120	2	
15.VII	27	180	230	2	
20.VII	32	170	290	2	

Кроме того, было установлено, что оба пути через разные промежутки времени приводят к одним и тем же показателям — накоплению сероводорода, развитию десульфурирующих бактерий и уплотнению грязи.

Чтобы проверить правильность выводов, сделанных на основании работ, проведенных на Сакской грязи, и получить более полное представление о ходе регенерационных процессов, в 1949 г. были проведены наблюдения на лечебных грязях, различных по физико-химическим и микробиологическим показателям, какими являются грязи: Тамбуканская (13° Bé) и Хапсальская (1,5° Bé). Данные опытов сведены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Изменения количества микроорганизмов при регенерации отработанной Тамбуканской грязи (13° Bé)

Дата	Дни от начала опыта	Количество бактерий в 1 г сырой грязи в тыс.				Развитие десульфурирующих бактерий—почернение осадка в среде Таусона в сутках	
		аэробы на МПА		анаэробы на среде Вильсон—Блера			
		контрольная	отработанная	контрольная	отработанная	контрольная	отработанная
12.IV	0	24	17	11	16	12	12
18.IV	6	—	18	—	50	—	5
20.IV	8	87	—	21	—	5	—
25.IV	13	—	90	—	70	—	6
29.IV	17	64	78	0,1	0,6	6	6
4. V	22	—	150	—	50	—	5
9, V	27	—	180	—	6,8	—	3
13. V	31	45	—	15	—	5	—
16. V	34	—	35	—	22	—	4
23. V	41	—	0,5	—	50	—	4
30. V	48	65	65	—	90	—	5
15.XI	213	13	54	3	26	6	6

Результатами опытов, проведенных на указанных грязях, удалось подтвердить правильность выводов, сделанных на основании работ с Сакской грязью.

Проведенные работы позволяют придти к заключению, что в образцах отработанных грязей пониженной солености с первых дней хранения

Таблица 4

Изменения количества микроорганизмов при регенерации отработанной Хапсальской грязи (1,5° Bé)

Дата	Дни от начала опыта	Количество бактерий в 1 г сырой грязи в тыс.				Развитие десульфурирующих бактерий—почернение осадка в среде Таусона в сутках	
		аэробы на МПА		анаэробы на среде Вильсон—Блера			
		контрольная	отработанная	контрольная	отработанная	контрольная	отработанная
6.V	0	700	80	47	8	3	10
11.V	5	—	1450	—	10	—	2
18.V	12	—	10500	—	90	—	3
24.V	18	—	2500	—	1200	—	3
6.VI	31	368	63600	80	100	4	4
15.XI	189	75	10	12	410	6	2

наступает увеличение количества аэробных и анаэробных микроорганизмов и повышение активности десульфурирующих бактерий.

Задачей наших работ было установление и сравнение сроков выживаемости аэробных неспоровых и анаэробных споровых бактерий в отработанной и в натуральной грязях.

Наблюдения по изучению сроков выживаемости бактерий, внесенных в регенерируемую прогретую и натуральную грязи, проводились на грязи Сакского озера.

Грязь для опыта была взята из-под гипсовой корки и характеризовалась высокой соленостью грязевого раствора (17° Bé), удельным весом 1,654, сопротивлением свигу 8800 дин/см² и небольшим числом аэробных и анаэробных бактерий.

Мы предполагали, что общая активация биологических процессов, наблюдаемая нами после прогрева грязей и добавления глюкозы в опытную грязь, должна отразиться и на выживаемости внесенных микроорганизмов, сокращая ее сроки.

Грязь прогревалась, за исключением контрольного образца, при следующих условиях: 55°—15′; 55°—60′; 65°—20′; 75°—5′.

Прогретая грязь раскладывалась в шесть равных по объему банок, из которых первая оставалась без изменения, во вторую добавлялась глюкоза, в третью — Bact. coli, в четвертую — глюкоза + Bact. coli, в пятую — Bac. sporogenes и в шестую — глюкоза + Bac. sporogenes.

Контрольных образцов было три: 1) непрогретая грязь, 2) непрогретая грязь + Bact. coli, 3) непрогретая грязь + Bac. sporogenes. Всего в опыте было 27 образцов. Глюкоза растворялась в рапе Сакского озера плотностью 17° Bé и вносилась в количестве 0,1 %

Бульонные культуры Bact. coli и Bac. sporogenes вносились в количестве 100 млн. клеток на 1 г сырой грязи и тщательно перемешивались с грязью в течение 15 минут.

Грязь в банках заливалась рапой 17° Bé и хранилась при температуре 17—20°.

Интенсивность микробиологических процессов учитывалась по изменению общего количества аэробных бактерий с учетом числа споровых форм.

Количественный учет внесенных бактерий производился методом предельных разведений, кишечная палочка — на среде Эйкмана и Bac. sporogenes — на среде Вильсон — Блера.

Для характеристики исходного и прогретых образцов грязи Сперанской были проведены определения начальной влажности и содержания сероводорода в начале опыта, на 25—50-й день опыта. Для определения

содержания органического вещества, усвояемого микроорганизмами, в данных образцах грязи проводился гидролиз проб грязи 0,5-*N* серной кислотой. В гидролизате определялись углерод и азот (табл. 5).

Таблица 5

Изменение влажности содержания сероводорода и гидролизуемых органических веществ при хранении прогретой Сакской грязи

Условия опыта	№ пробы	Влажность в %	Начало опыта		После 25 дней	После 50 дней	Гидролизуемые	
			общий сероводород в %				азот	углерод
			к абс. сухому весу грязи	к сырому весу грязи	к сырому весу грязи		в % от абс. сухого веса грязи	
Без глюкозы								
Непрогретая	I	36,92	0,46	0,29	0,26	0,27	0,018	0,393
55°—15′	II	35,89	0,44	0,28	0,28	0,29	0,015	0,740
55°—60′	III	37,70	0,44	0,27	0,29	0,26	0,019	0,754
65°—20′	IV	36,35	0,45	0,29	0,31	0,30	0,019	—
75°— 5′	V	36,45	0,44	0,28	0,28	0,27	0,016	0,673
С добавлением глюкозы								
55°—15′	1	35,89	0,44	0,28	0,29	0,29		
55°—60′	2	37,70	0,44	0,27	0,29	0,31	не опре-	не опре-
65°—20′	3	36,35	0,45	0,45	0,29	0,30	делялся	делялся
75°— 5′	4	36,45	0,44	0,28	0,30	0,30		

Данные табл. 5 показывают, что количество углеродсодержащих гидролизуемых органических соединений под действием температуры увеличивается в два раза по сравнению с исходной грязью. Азотсодержащие соединения остаются почти без изменения.

Повышение температуры от 55 до 75° и длительность прогревания в данном опыте не оказали существенного влияния на содержание углерода в полученных гидролизатах.

Таблица 6

Изменения общего количества бактерий, споровых форм аэробов, количества клеток Bact. coli и клеток Bac. sporogenes в 1 г Сакской грязи в тыс.

Образцы грязи	Дата	Сроки от начала опыта	Общее количество аэробов	Количество споровых аэробов	Количество клеток Bact. coli	Количество клеток Bac. sporogenes
Контрольный до прогрева	19.IX 1949 г.	0	20	17	—	—
	9.XI	50 дн.	61	4	—	—
	14.V 1951 г.	20 мес.	24	4	—	—
Прогрев 55° — 60′ с добавлением Bact. coli	19.IX 1949 г.	0	18	7	100	—
	9.XI	50 дн.	28	9	0,1	—
	14.V 1951 г.	20 мес.	24	11	—	—
Прогрев 55° — 60′ с добавлением глюкозы и Bact coli	19.IX 1949 г.	0	36	9	100	—
	9.XI	50 дн.	20	14	0,1	—
	14.V 1951 г.	20 мес.	37	7	—	—
Прогрев 55° — 60′ с добавлением Bac. sporogenes	19.IX 1949 г.	0	64	21	—	10000
	9.XI	50 дн.	45	15	—	1000
	14.V 1951 г.	20 мес.	34	4	—	100
Прогрев 55° — 60′ + глюкоза и Bac. sporogenes	19.IX 1949 г.	0	75	19	—	10000
	9.XI	50 дн.	60	9	—	10000
	14.V 1951 г.	20 мес.	13	6	—	1000

Примечание: Данные промежуточных наблюдений отклонений не имели. Подсчет количества аэробов производился через 6 суток, количества анаэробов через 2 суток.

Результаты микробиологических наблюдений приведены в табл. 6.

Через 50 дней от начала опыта значительного размножения аэробных бактерий не наблюдалось даже в образцах с добавлением глюкозы.

Количество внесенных клеток Bact. coli к 50-му дню от начала опыта значительно снизилось (от 10^8 до 10^2) и через 100 дней от начала опыта внесенные клетки Bact. coli полностью погибли.

Количество клеток Bac. sporogenes через 600 дней от начала опыта уменьшилось с 10^8 до 10^6.

Дополнительным опытом нами было установлено, что сероводород не оказывает бактерицидного действия на Bac. sporogenes. Результаты опыта приведены в табл. 7.

Таблица 7

Изменения количества клеток Bac. sporogenes под влиянием различных концентраций сероводорода

Часы пребывания бактерий в растворах	Контроль непрогретый	Контроль прогретый	Концентрации H_2S в сероводородных растворах				
			2,3 г/л	1,4 г/л	0,9 г/л	0,7 г/л	0,4 г/л
0	3250	1005	1200	1635	1440	1530	1290
1	3450	870	930	1350	930	1620	1020
5	1455	1155	870	1035	1200	1260	930
23	2100	810	690	720	300	495	540
120	1350	2350	610	300	75	330	400

Примечание: Сероводородные растворы приготовлялись насыщением физиологического раствора. Посевы Bac. sporogenes производились на среду Вильсон-Блера.

Полученные результаты (незначительные изменения общего количества бактерий и содержания сероводорода в образцах грязи в течение опыта) указывают на то, что при хранении грязи после ее прогрева и при добавлении 0,1% глюкозы интенсивного развития биологических процессов в ней не происходило. Выживаемость внесенных микроорганизмов была продолжительной как для прогретой, так и для непрогретой грязи: для аэробных неспоровых бактерий — 100 дней, для анаэробных споровых бактерий — более 20 месяцев.

В опыте был взят непатогенный микроорганизм, и благодаря этому не могли производиться наблюдения по изменению его вирулентных свойств.

Микробиологическими анализами, проведенными на грязи Сакского озера, непосредственно на курорте, удалось из озерной грязи выделить патогенный анаэробный споровый микроорганизм (Bac. perfringens) и проследить за изменением его вирулентности при регенерации отработанной грязи в бассейнах.

Грязь, взятая в весенне-летний период из озера, и грязь, использованная на больных, содержала вирулентную форму Bac. perfringens.

После регенерации отработанной грязи в бассейнах в течение 3—4 месяцев вирулентные свойства Bac. perfringens биологической пробой на мышах не обнаруживались.

Если учесть продолжительную выживаемость анаэробных споровых бактерий в опытной грязи, можно предположить, что сроки регенерации отработанной грязи Сакского озера должны быть такими же продолжительными.

Чтобы определять сроки регенерации грязи в зависимости от вирулентных свойств патогенных бактерий, необходимо изучать вопрос вос-

становления утерянных вирулентных свойств бактериями при регенерации грязи в бассейнах в зависимости от условий окружающей среды. Более подробное изучение этого практически важного и сложного вопроса будет нашей дальнейшей работой.

Выводы

1. В процессе регенерации отработанной лечебной грязи, содержащей гнилостную анаэробную микрофлору, первой стадией процесса является усиленное развитие гнилостных анаэробных микроорганизмов (гнилостная стадия), с последующим развитием десульфурирующих бактерий.
2. При регенерации отработанной грязи, не содержащей гнилостной анаэробной микрофлоры, сразу начинается развитие десульфурирующих бактерий.
3. В прогретой Сакской грязи сроки выживания аэробных неспоровых форм (Bact. coli) значительно короче (3 мес.) по сравнению со сроками выживания анаэробных споровых бактерий (Bac. sporogenes) (более 20 месяцев).
4. При регенерации отработанной Сакской грязи в условиях курорта анаэробные споровые микроорганизмы (Bac. perfringens) теряют вирулентность через три месяца.
5. Сроки регенерации отработанной грязи должны определяться сроками выживания в ней споровых анаэробных микроорганизмов.

Центральный институт курортологии
Москва

Получено 14.VII.1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азбелев В. Н., Игнатович З. А., Богатая В. Н. О сохранении жизнеспособности патогенных бактерий в рапе и грязи Сакского озера. Саки-курорт, 1, 1935.
2. Волкова О. Ю. К вопросу о присутствии патогенных микроорганизмов в Тамбуканской грязи. Тр. Гос. бальнеологич. ин-та Кавказ. мин. вод., 13, вып. 4, 1935.
3. Волкова О. Ю. О длительности выживания патогенных микроорганизмов в Тамбуканской грязи в свете ее бактерицидных свойств. Тр. Гос. бальнеологич. ин-та Кавказ. мин. вод, 28, 1949.
4. Волкова О. Ю. и Балабанова А. В. О бактерицидных свойствах Тамбуканской грязи. Микробиология, XIII, вып. 6, 1944.
5. Иванов П. Г. Старорусские минеральные лечебные средства и болезнетворные микроорганизмы. Врач. газета, № 25, 1912.
6. Рубенчик Л. И., Гойхерман Д. Г., Райх Б. Я. О выживаемости болезнетворных бактерий в грязи и рапе Одесских лиманов, Тр. Всеукраинского бальнеофизиотерапевт. ин-та, вып. 1, 1932.
7. Свешникова И. А. К вопросу о бактерицидности Тамбуканской грязи. Тр. Гос. бальнеологич. ин-та Кавказ. мин. вод, 5, 1927.

ПОЛУЧЕНИЕ ФАГОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ С ЦЕННЫМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СВОЙСТВАМИ

Е. Н. Дерябина

Лизис молочнокислых стрептококков бактериофагом, сопровождающийся несквашиванием молока,— явление, весьма распространенное при производстве заквасок [2, 4, 5, 8, 9, 11].

Несквашивание заквасок часто наблюдается на сыродельных заводах. Повидимому, сам процесс выработки сыра способствует активизации и размножению бактериофага, а сыр и подсырная сыворотка являются благоприятной средой для его сохранения. По данным Рунова [6], бактериофаг всегда имеется в сыре и сохраняется в нем годами.

При сильном заражении сыродельного завода бактериофагом приготовление доброкачественной закваски становится затруднительным. Поэтому при производстве заквасок на сыродельных заводах особого внимания заслуживает вопрос об использовании устойчивых к бактериофагу культур молочнокислых стрептококков. В литературе имеются указания на целесообразность применения для заквасок молочнокислых стрептококков, устойчивых к бактериофагу [1, 3, 5, 7, 10].

В Институте сыроделия с 1947 г. производится подбор культур для заквасок с учетом их отношения к бактериофагу. С этой целью все выделенные из различных кисломолочных продуктов и отобранные по органолептической оценке молочнокислые стрептококкии испытываются на чувствительность к ряду поливалентных и специфических бактериофагов, имеющихся в коллекции института, и к фагам, вновь найденным на производстве [1]. Среди выделенных культур молочнокислых стрептококков встречается большое количество нечувствительных к бактериофагу, которые и используются для производства заквасок.

Однако среди молочнокислых стрептококков имеются культуры, чрезвычайно ценные для производства, но отличающиеся от других стрептококков большей чувствительностью к бактериофагу. Это культуры Streptococcus diacetilactis, дающие значительные количества диацетила, летучих кислот и эфиров — веществ, обуславливающих аромат закваски и кислосливочного масла. Культуры Str. diacetilactis, дающие большие количества диацетила и поэтому особенно ценные для производства, встречаются в природных условиях сравнительно редко. За семь лет нам удалось выделить из природных условий лишь несколько таких культур. Закваски, в состав которых входят подобные культуры Str. diacetilactis, в производственных условиях довольно часто утрачивают способность к образованию диацетила и ценность их теряется. Чаще всего это происходит вследствие выпадения культур Str. diacetilactis из состава заквасок в результате лизиса этих культур под воздействием бактериофага.

Целью настоящей работы являлось получение устойчивых к бактериофагу культур Str. diacetilactis с ценными для производства биохимическими свойствами. Для этого использовалась способность бактерий образовывать в процессе бактериофагического лизиса устойчивые к фагу клетки, так называемые культуры вторичного роста. Для получения культур вторичного роста нами были применены бактериофаги, выделенные из производственной закваски для масла. Бактериофаги эти были специфичными для группы Str. diacetilactis и не лизировали ни одного фагочувствительного штамма Str. lactis. В то же время они были поливалентными, так как лизировали целый ряд различных культур Str. diacetilactis. Путем обработки фагом чувствительной культуры Str. diacetilactis удалось получать вторичные культуры, в основной массе сохранявшие ценные биохимические свойства исходной, но отличавшиеся устойчивостью к бактериофагу. Такой путь получения устойчивых к фагу штаммов в данном случае оказался более эффективным, чем выделение подобных, но редко встречающихся культур из природных условий.

При проведении работы мы пользовались следующим простым приемом. Пробирки со стерильным обезжиренным молоком, подкрашенным метиленовой синью, заражались 3% чувствительной культуры и 0,1—1% бактериофага и ставились в термостат при 30°. В первые четыре часа после заражения через каждые 30 минут производилось встряхивание пробирок и наблюдение за изменением окраски молока. Обычно в первые часы происходит нормальное развитие культуры, в результате чего окислительно-восстановительный потенциал молока падает, метиленовая синь восстанавливается и среда белеет. Затем наступает момент лизиса, что вызывает резкое повышение окислительно-восстановительного потенциала и посинение молока. В препарате в этот момент имеются единичные клетки или чаще они совсем отсутствуют. Для получения устойчивых к фагу клеток культура после лизиса оставляется в термостате до тех пор, пока в ней не разовьются устойчивые к фагу клетки. На появление и размножение устойчивых клеток Str. diacetilactis указывает побеление молока и последующее его свертывание. Время появления устойчивых клеток бывает различным и зависит от свойств культуры и фага. В одних случаях они появляются вскоре после лизиса, в других — через несколько суток.

Развившаяся после лизиса популяция высевается на чашку Петри с МПА, которая помещается в термостат при 30°. Через 48 часов выросшие отдельные колонии выделяются в пробирки с молоком и выдерживаются при 30°. Выделенные культуры после свертывания молока и нескольких пересевов в молоко проверяются на чувствительность к фагу и на наличие в них фага.

Проверка культур на чувствительность к фагу проводилась на твердой среде по Отто и в молоке с метиленовой синью по методу, предложенному Яковлевым [8]. При проверке на твердой среде мы пользовались агаром из подсырной сыворотки с 0,5% пептона, так как было установлено, что эта среда способствует лучшему проявлению лизиса, чем МПА.

Среди культур вторичного роста встречались еще фагочувствительные клетки, но подавляющая их масса была фагоустойчивой (табл. 1).

Таблица 1

Число выделенных фагоустойчивых культур

№ исходной культуры	Число выделенных культур	Из них	
		фагоустойчивых	фагочувствительных
8	24	18	6
13	24	23	1

Отобранные фагоустойчивые культуры проверялись на лизогенность следующими двумя способами.

1. Одна капля проверяемой культуры равномерно наносилась шпателем Дригальского на поверхность чашки Петри с застывшим сывороточным агаром (агара 1,5%). После инкубации в течение 24 часов при 30° чашка просматривалась и отмечалось наличие или отсутствие так называемых стерильных пятен.

2. Проверяемая фагоустойчивая и исходная — фагочувствительная культуры засевались в колбу со стерильным молоком (по 0,2% каждой). В течение первых четырех часов для лучшего контактирования фага с бактериальными клетками колба взбалтывалась каждые 30 минут. Через 24—40 часов инкубации при 30° молоко свертывалось. Для лучшего выделения сыворотки образовавшийся сгусток подогревался до 45°, сыворотка отфильтровывалась через бумажный фильтр и затем через фильтр Зейтца. Полученный фильтрат проверялся на наличие фага путем воздействия на фагочувствительную и на проверяемую фагоустойчивую культуру (по Отто, и в молоке с метиленовой синью).

Культура считалась нелизогенной, если при проверке первым и вто-

рым способом на твердой среде не обнаруживались стерильные пятна и при проверке вторым способом в молоке с метиленовой синью происходило нормальное развитие молочнокислых стрептококков и свертывание молока в пробирках с фильтратом наступало одновременно с контрольной.

Большинство полученных фагоустойчивых штаммов по биохимическим свойствам не отличалось от исходных культур (табл. 2). Лучшие из них оставлялись в коллекции и использовались для производства заквасок. Закваски, в состав которых входили эти культуры, отличались хорошим вкусом и ароматом.

Таблица 2

Биохимическая характеристика фагоустойчивых культур

(в обезжиренном молоке при заражении 1 % культуры с выдержкой при 30° в течении 40 часов)

Исследования	Исходные культуры	Культуры вторичного роста									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Str. diacetilactis № 8											
Кислотность в Т° . .	76	72	76	75	73	80	75	70	78	71	77
Летучие кислоты в 100 мл дестил. . .	2,2	2,1	2,2	2,0	2,1	2,3	2,0	1,8	2,3	2,2	2,2
Диацетил	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	+++
Str. diacetilactis № 13											
Кислотность в Т° . .	80	82	80	76	82	81	78	82	83	78	74
Летучие кислоты в 100 мл дестил. . .	2,4	2,3	2,0	2,4	2,2	2,1	2,3	2,4	2,4	2,3	2,4
Диацетил	+++	+++	++	+++	+++	++	++++	++++	+++	+++	++

Периодически проводилась проверка полученных таким образом культур на чувствительность к бактериофагу, под воздействием которого они образовались, а также к фагам, вновь выделенным из производственной закваски и из сыров. Проверки показали, что культуры со временем утрачивали свои резистентные свойства и становились чувствительными к фагу. Однако путем повторных обработок культур бактериофагом удавалось вновь получать штаммы, устойчивые к фагу. Так, штаммы, полученные путем обработки культуры Str. diacetilactis № 8 фагом № 16, через 3 месяца, оставаясь устойчивыми к фагу № 16, лизировались фагом № 17, вновь выделенным из производственной закваски. Обработав культуру фагом № 17, мы получили штаммы, устойчивые к фагам № 16 и № 17, однако через $2^1/_2$ месяца они стали чувствительными к фагам № 16 и № 17 и были еще раз обработаны этими фагами. Полученные после третьей обработки штаммы сохраняли устойчивость к бактериофагу и ценные биохимические свойства в течение 22 месяцев. За этот период в производственной закваске завода ни разу не был обнаружен фаг, способный лизировать данные культуры, несмотря на то, что они постоянно входили в состав закваски. Лишь через 22 месяца при сильной вспышке бактериофага в производственной закваске был обнаружен бактериофаг, способный их лизировать. Культуры, оставаясь устойчивыми к фагам № 16 и 17, лизировались этим новым фагом, повидимому, адаптировавшимся к данным культурам в результате длительного, бессменного применения их в производстве. Новый фаг отличался нестойкостью при хранении, но получить устойчивые к нему клетки было значительно труднее, чем к предыдущим фагам, так как среди вторичных культур встречалось большое количество лизогенных. Однако устойчивые культуры вновь были получены и обладали теми же полезными биохимическими свойствами.

Сравнительная простота приема получения устойчивых к фагу штаммов из чувствительных культур и способность их довольно долго сохранять резистентные свойства указывают на целесообразность использования этого метода для получения устойчивых к фагу ценных для производства культур Str. diacetilactis. Как уже указывалось, выделение из природных условий культур Str. diacetilactis, дающих диацетил, представляет значительные трудности, так как они сравнительно редко встречаются.

Выводы

1. Культуры Str. diacetilactis, входящие в состав заквасок и образующие значительные количества диацетила и летучих кислот, играют большую роль в улучшении аромата и вкуса масла. Однако они являются более чувствительными к бактериофагу по сравнению с другими молочнокислыми стрептококками и чаще выпадают из состава закваски под воздействием бактериофага, в результате чего закваска теряет способность к образованию ароматических веществ.

Путем обработки бактериофагом чувствительных культур Str. diacetilactis, дающих большие количества диацетила, можно получить штаммы, устойчивые к бактериофагу и сохраняющие ценные биохимические свойства исходной культуры.

3. Устойчивость полученных культур Str. diacetilactis по отношению к бактериофагу со временем утрачивается, но путем повторной обработки культур фагом можно вновь получить штаммы с теми же биохимическими свойствами, но устойчивые к бактериофагу. Полученные таким образом штаммы сохраняли устойчивость к бактериофагу в течение 22 месяцев при использовании их в заводских условиях.

4. Значительно труднее получать устойчивые штаммы по отношению к бактериофагу, адаптировавшемуся ко вторичным культурам, полученным после трехкратной обработки фагом культуры Str. diacetilactis.

Всесоюзный научно-исследовательский институт сыродельной промышленности
г. Углич

Получено 20.XII.1952 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гибшман М. Р. и Дерябина Е. Н. Специфичность бактериофагов молочнокислых стрептококков. Молочная промышленность, № 11, 1948.
2. Либерман Л. А. Бактериофаг Str. lactis в процессе созревания голландских сыров. Мікробіологічний журнал АН УССР, XIII, вып. 1, 1951.
3. Медвинская Л. Ю. Фагочувствительность и серологические свойства. Мікробіологічній журнал АН УССР, XIII, вып. 1, 1951.
4. Непомнящая М. Л., Либерман Л. А. и Медвинская Л. Ю. Явление бактериофагии в молочной промышленности. Мікробіологичній журнал АН УССР, IX, № 2—3, стр. 34, 1948.
5. Палладина О. К., Перетц Л. Г. и Мазюкевич В. А. О борьбе с бактериофагом молочнокислого стрептококка. Микробиология, XII, вып. 1, 1943.
6. Рунов Е. В. Распространенность стрептококкового бактериофага в сырах. Микробиология, XVIII, 174, 1949.
7. Рунов Е. В., Коноплева Е. П. и Сокольская А. П., Бактериофаг в сыроделии. Устойчивость молочнокислых стрептококков к бактериофагу из сыра. Микробиология, XIX, вып. 4, 1950.
8. Яковлев Д. А. Бактериофаг молочнокислых стрептококков. Микробиология, VIII, вып. 8, 932, 1939.
9. Babel F. J. Studies on the susceptibility of certain cheese cultures to the action of bacteriophage. J. Dairy Sci., XXX, No. 7, 507, 1947.
10. Nichols A., Hoyle M. Bacteriophage in typing Lactic Streptococci. J. Dairy Res., **16**, No. 2, 167, 1949.
11. Whitehead H. R. and Hunter G. J. Bacteriophage infection in cheese manufacture. J. Dairy Res., **14**, 64, 1945.

ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАНА МИКРООРГАНИЗМАМИ [1]

(Обзор)

Н. Б. Нечаева

Уже в конце XVIII в. ученые обратили внимание на то, что из влажных почв, богатых органическими соединениями, выделяется особый газ, который Вольта (Volta, 1776) назвал «воспламеняющимся воздухом». В 1875 г. Л. Попов произвел исследование брожения гуммиарабика и установил, что в результате него образуются CO_2, H_2 и CH_4 (6%). В 90-х годах XIX в. молодой выдающийся русский ученый В. Л. Омелянский приступил к исследованию различных биологических процессов, сопровождающихся выделением CH_4. Благодаря большому разнообразию исследованных органических веществ Омелянскому удалось показать насколько широко распространено метановое брожение в природе.

С начала XX в. уже ведется систематическое исследование образования CH_4 из органических веществ и CO_2 или CO с молекулярным H_2. Этим процессам посвящено много работ, но до 1936 г. не было выделено чистых культур бактерий, вызывающих данные процессы (Баркер, Barker, 1936 b). Объяснялось это тем, что метанообразующих бактерий чрезвычайно трудно изолировать, так как они являются очень строгими анаэробами. Кроме того, метанообразующие бактерии медленно развиваются в культурах, что зависит от окислительно-восстановительных процессов, вызываемых ими, в которых акцептором водорода является углекислота. Эти процессы сопровождаются незначительным выделением энергии.

Метанообразующие бактерии играют важную роль в круговороте веществ, ассимилируя CO_2, CO и H_2 и синтезируя из них углеводород, (CH_4) и свое клеточное вещество. В то же время они способствуют минерализации разнообразных азотистых и безазотистых соединений в анаэробных условиях, разлагая часто такие вещества, которые недоступны другим бактериям.

Образование метана в растворах солей жирных кислот

Ученые давно интересовались широко распространенным в природе метановым брожением солей уксусной и масляной кислот, являющихся обычными продуктами распада как азотистых, так и безазотистых веществ.

Так, в 1887 г. Гоппе-Зейлер (Hoppe-Seyler) опубликовал свои опыты по брожению кальциевых солей уксусной кислоты, конечными продуктами которых были CO_2 и CH_4.

В 1902 г. Омелянский показал образование CH_4 не только при брожении солей уксусной, но и масляной кислот, при этом количество CH_4 составляло 95% от общего объема газа и только 5% приходилось на CO_2. Брожение было вызвано заражением 0,2—0,1% коровьего навоза минеральной среды с добавлением к ней какой-нибудь соли вышеуказанных кислот и пептона. Брожение не ослабевало в течение трех

[1] В статье рассматривается образование CH_4 из жирных кислот, спиртов и CO_2 или CO с молекулярным H_2.

лет, пока велось исследование. Было замечено, что в среде с пептоном CH_4 образовывалось меньше (69—84%), чем в среде без пептона.

В культуре, очищенной пересевами, Омелянский, повидимому, наблюдал ту же «псевдосарцину» и сопутствующих ей спороносных палочек, что и позднее Мазе (Mazé, 1903, 1915) при метановом брожении солей уксусной кислоты и ацетона. Разложение ацетона «псевдосарциной» оспаривается другими исследователями, так как псевдосарцину можно было наблюдать только тогда, когда в культурах уже появлялись некоторые жирные кислоты — продукты разложения ацетона. Результаты опытов Омелянского показали, что культура «псевдосарцины» сбраживает до CH_4 не только соли уксусной, но и масляной кислот по следующим уравнениям:

$$2C_2H_3O_2K + H_2O = K_2CO_3 + CO_2 + 2CH_4$$
$$(C_4H_7O_2)_2Ca + 3H_2O = CaCO_3 + 2CO_2 + 5CH_4.$$

Таким образом, Омелянский экспериментально доказал разложение исследуемых солей органических кислот на CH_4 и CO_2.

С 1906 г. голландский ученый Зенген (Söhngen) также начинает изучать метановое брожение различных жирных кислот. Из накопительных культур он выделил палочкообразную бактерию и крупную сарцину, возбудителей метанового брожения, но получить их чистые культуры ему не удалось. Эти бактерии не образовывали колоний ни на одной из испытанных автором плотных средах (МПА, солодовый агар и минеральный агар с 1% маслянокислого кальция). Разделить их друг от друга удалось только благодаря различному отношению бактерий к температуре высушивания.

Эти микроорганизмы образовывали CH_4 при разложении в анаэробных условиях солей органических кислот с четным числом атомов углерода и прямой цепочкой, как, например, уксусная кислота, масляная, капроновая, каприловая, каприновая. Разложение этих солей проходило по уравнениям, которые уже раньше вывел Омелянский для метанового брожения солей уксусной и масляной кислот.

Исследованные соли жирных кислот с нечетным числом атомов углерода — пропионовой, валериановой, энантовой и пеларгоновой — не подвергались метановому брожению за исключением солей муравьиной кислоты. Разложение солей муравьиной кислоты, проходило следующим образом:

$$2\,(CHOO)_2\,Ca \rightarrow CH_4 + CO_2 + 2CaCO_3$$

(Söhngen, 1910). При дальнейшем изучении механизма разложения кислоты выяснилось, что ее распад может идти по формуле

$$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O + 39\ \text{ккал}$$

(Stephenson a. Stickland, 1933).

Красина (1936) изучала разложение солей муравьиной кислоты при различных окислительно-восстановительных потенциалах среды с выделенной ею культурой бактерии. Результаты ее исследований установили прямую зависимость между rH среды и продуктами разложения кислоты. Например, при постановке опытов по схеме Омелянского при rH = = 12—12,9 распад солей муравьиной кислоты шел с образованием водорода.

$$(HCOO)_2Ca + H_2O = CaCO_3 + CO_2 + 2H_2.$$

При введении H_2, в опытные сосуды по схеме Стефенсона и Стикленда (Stephenson a. Stickland, 1933) при rH = 6—7 соли муравьиной кислоты разлагались с выделением CH_4

$$HCOOH + 3H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O.$$

В дальнейшем предположение Зенгена, что метанообразующие бактерии не способны сбраживать соли жирных кислот с нечетным числом атомов углерода или с разветвленной цепочкой, было опровергнуто другими исследователями (Coolhaas, 1928; Neave with Buswell, 1930; Thayer, 1931; Symons a. Buswell, 1933; Stadtman a. Barker, 1951 a, 1951 b).

В 1928 г. Коольхаас (Coolhaas) выделил термофильную бактерию, которая была способна сбраживать с образованием CH_4 ряд солей жирных кислот: муравьиной кислоты, уксусной, пропионовой, изомасляной и некоторых других кислот. Автор исследования не мог отождествить свою бактерию с выделенными ранее, но Баркер (1936 b) определил ее как разновидность вида Methanobacterium söhngenii, поскольку она была морфологически близка к этому виду и отличалась от него только отношением к высокой температуре.

Начало брожения кальциевых солей уксусной кислоты наблюдалось в культурах этого термофила всего быстрее при 32°, но газа образовывалось больше при 63°. Культура термофильной бактерии не была чистой.

В 1940 г. Симакова выделила из осадка сточных вод в метантенках очень тонкую, подвижную, бесспоровую палочку, активно сбраживающую соли уксусной и масляной кислот до CH_4 (83—85%) и CO_2. Она успешно применила метод Виноградского с кремнекислыми пластинками в анаэробных условиях для получения чистых культур метанообразующих бактерий. Этот метод был использован впервые для выделения данной группы организмов.

В 1951 г. Стадтмен и Баркер (Stadtman a. Barker) выделили из черного ила Сан-Францисского залива три новых вида метанообразующих бактерий — две палочки и один кокк, названных: Methanobacterium suboxydans, Methanobacterium propionicum и Methanococcus vannielii. Палочки производили неполное окисление жирных кислот, чем отличались от ранее выделенных метанообразующих бактерий. В культурах обоих организмов часто наблюдались сульфатвосстанавливающие вибрионы. M. propionicum не была очищена до конца, так как она развивалась медленно — от 25 до 60 дней до начала газообразования.

Третий вид метанообразующих бактерий — подвижный кокк — быстро развивался на щелочной, обычной минерально-бикарбонатной среде с солями муравьиной кислоты и активно образовывал CH_4. Культура этого микроба была очищена от своего спутника-палочки с большим трудом и только благодаря многочисленным пересевам в агар с большим разведением и с изменением в среде концентрации водородных ионов в щелочную сторону. Спутник кокка не образовывал CH_4 при расщеплении солей муравьиной кислоты, а выделял из них CO_2 и H_2. Брожение муравьинокислого натрия с чистой культурой кокка не вполне отвечало уравнению по количеству образовавшихся продуктов

$$4HCOONa + H_2O \rightharpoonup Na_2CO_3 + 2NaHCO_3 + CH_4,$$

так как, кроме CH_4 и CO_2, еще образовывался H_2.

Было замечено, что в течение первых 24 часов брожения получался почти чистый CH_4, H_2 было всего около 5%. В дальнейшем количество H_2 начинало быстро увеличиваться и уже к 38 часам газ состоял из 40% H_2 и 60% CH_4. К этому же времени сильно подщелачивалась среда (pH = 9,0). Повидимому, изменение pH среды меняло направление процесса, как уже было отмечено в работе Красиной при различных rH_2 и окисление муравьинокислого натрия начинало идти с выделением H_2 по формуле:

$$HCOONa + H_2O \rightarrow NaHCO_3 + H_2.$$

Образование метана на средах с различными спиртами

Омелянский (1916) приводит в своей работе о метановом брожении этилового спирта литературу, из которой видно, что все исследования спиртов проводились в аэробных условиях. Омелянский же поставил своею задачей исследовать анаэробное разложение этилового спирта на чисто минеральной среде. Среда сначала заражалась огородной землей, но после нескольких отрицательных результатов был сделан посев пометом кролика, которого в течение двух недель до опыта поили 1—2%-ным этиловым спиртом. Результаты получились положительные и анализ образовавшегося газа и культуре в конце опыта показал присутствие CH_4 в большом количестве (87—98%). Возбудителем метанового брожения этилового спирта была тонкая, длинная, слабо изогнутая палочка. Впоследствии Баркер (1936 b) назвал данный организм Methanobacterium omelianskii в честь Омелянского, первого исследователя анаэробного расщепления этилового спирта, открывшего вышеуказанную бактерию. Омелянский предложил для изучения метанового брожения спирта питательную среду: дистиллированная вода, фосфорнокислый калий — 0,1%, сернокислый магний — 0,05%, фосфорнокислый аммоний — 0,1%, хлористый натрий — следы, мел и этиловый спирт по 1%. Эта среда в основном применяется и до сих пор, но с некоторыми изменениями, например, источником азота большей частью является хлористый аммоний вместо фосфорнокислого аммония; фосфорнокалиевые соли часто берутся в таком отношении друг к другу, чтобы забуферить среду. Добавляют иногда соли: марганца, железа и молибденовой кислоты. К стерильной среде прибавляют стерильные растворы: карбоната или бикарбоната натрия и сульфида натрия. Последний раствор создает более строгие анаэробные условия. Для этой же цели употребляют насыщенный раствор хлористого хрома, которым пропитывают кусочек ваты, помещенный в шейке опытного сосуда, чтобы удалить последние следы кислорода. Кроме того, Клюйвер и Шнеллен (Kluyver a. Schnellen, 1947) рекомендуют непрерывное качание культуры для лучшего соприкосновения бактериальных клеток с газовой смесью.

В 1936 г. Баркер провел опыты с этилом, пропиловым и бутиловым спиртами в присутствии CO_2, при заражении минеральной среды осадком сточной жидкости.

Он получил энергичное метановое брожение на всех взятых спиртах и показал, что спирты окислялись до соответствующих жирных кислот, отдавая водород на восстановление CO_2 до CH_4. Этиловый спирт окислялся до уксусной кислоты, бутиловый спирт до масляной кислоты и т. д.

Возбудителем разложения спиртов был организм, похожий на описанный Омелянским.

В 1937 г. Баркер исследовал более сложное метановое брожение этилового спирта, возбудителями которого являлись M. omelianskii и один или два спороносных вида типа Plectridium. При этом брожении, кроме уксусной кислоты, были найдены масляная, капроновая и, судя по резкому запаху от культуры, образовались и некоторые высшие спирты, возможно капроновый спирт.

Баркер считал, что все указанные продукты брожения, кроме CH_4, могли образовать спорообразующие бактерии из уксусного альдегида, первого продукта дегидрирования этилового спирта:

$$CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CHO + 2H.$$
$$CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H.$$
$$2CH_3CHO \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH.$$
$$3CH_3CHO + 2H \rightarrow CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH + H_2O.$$

Метан же получался по формуле:

$$2C_2H_5OH + 2H_2O + CO_2 \rightarrow 2CH_3COOH + CH_4 + 2H_2O.$$

под влиянием M. omelianskii.

В 1941 г. началось детальное изучение биохимических свойств M. omelianskii. Исследовалось много разнообразных органических веществ и выявилось, что M. omelianskii использовала простые первичные и вторичные спирты (высшие спирты не исследовались). Первичные спирты окислялись до соответствующих жирных кислот, а вторичные до кетонов. Метиловый спирт и соли жирных и ароматических кислот не усваивались.

Дальше было показано, что, во-первых, уксусная кислота, которая получалась в результате дегидрирования этилового спирта, не может быть использована M. omelianskii; во-вторых, что углерод спирта и углекислоты частично превращался в органическое вещество бактериальных клеток, и, в-третьих, что окислительным агентом у M. omelianskii могла быть только углекислота (были испытаны: кислород, метиловый спирт, муравьиная кислота, нитраты и сульфаты) (Баркер, 1941).

Образование метана из углекислоты или окиси углерода при помощи молекулярного водорода

Образование CH_4 при восстановлении CO_2 молекулярным H_2 впервые открыто Зенгеном (1910). Этот процесс вызывался теми же очищенными культурами микробов, под влиянием которых происходило метановое брожение муравьиной кислоты. Перед постановкой опыта Зенген культивировал микробов на солях муравьиной кислоты и, получив активную культуру, заражал ею минеральную среду. Опыты ставились в особых сосудах объемом 300 мл. В сосуды вводилась под давлением газовая смесь из H_2 и CO_2. Эта смесь газа добавлялась в сосуды несколько раз в течение опыта, и отношение количества H_2 к количеству CO_2 было несколько большее, чем 4 к 1. В результате чего было найдено в конце опыта около 35% H_2 и 65% CH_4. Углекислота исчезла вся. Таким образом, можно было предположить, что процесс шел по уравнению

$$CO_2 + 4H_2 = CH_4 + 2H_2O + 62 \text{ ккал}$$

(Söhngen, 1910, Рабинович, 1951).

Фишер, Лиске и Винцер (Fischer, Lieske u. Winzer, 1931, 1932) повторили опыты Зенгена по восстановлению CO_2 до CH_4 в присутствии молекулярного H_2 и, кроме того, провели исследования по образованию CH_4 из CO и H_2. Следует отметить, однако, что авторы изучали эти процессы в осадках сточных жидкостей или в смешанных культурах, где одновременно могли происходить самые разнообразные процессы под влиянием деятельности различных микроорганизмов.

Они нашли, что CO превращалась в CH_4 ступенчато, т. е. сперва CO окислялась до CO_2 водой с выделением H_2, а уже потом процесс шел, как было показано у Зенгена. При этом исследователи постоянно наблюдали в культурах присутствие органических кислот и альдегидов. На этом основании они предположили, что уксусная кислота, которая чаще других кислот наблюдалась в культурах, являлась важным промежуточным соединением при биологическом образовании CH_4 из CO_2 и H_2, и этим они запутали механизм данного процесса и надолго отодвинули истинное представление о нем.

В это же время Стефенсон и Стикленд (1931) выделили из реки «Уазы» чистую, как они считали, культуру.

[Баркер (1936) сомневается в том, что они выделили чистую культуру

метанообразующих бактерий, основываясь на описании культуры и метода выделения бактерии].

Выделенная бактерия была способна восстанавливать CO и CO_2 газообразным H_2 до CH_4 по формулам:

$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2.$$
$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O.$$

(Повидимому, образование уксусной кислоты в их культурах не происходило, так как авторы не упоминают об этом).

Стефенсон и Стикленд изучали образование CH_4 с суспензией бактериальных клеток, отмытых от солей органических кислот [2] и помещенных в сосуд с фосфатным буфером в атмосферу CO_2 или CO и H_2.

Опыты показали, что из одной молекулы CO_2 образовывалась одна молекула CH_4. Этот же микроорганизм восстанавливал сульфаты молекулярным H_2 до H_2S.

Исследователи нашли у своей метанообразующей бактерии энзимы: гидрогеназу и гидрогенлиазу и изучили их.

Такую же способность активировать H_2 и при его посредстве восстанавливать различные соединения наблюдала Беляева (1950) у многих исследованных ею водородоокисляющих бактерий.

Стефенсон и Стикленд представляли себе восстановление сульфатов свободным H_2 следующим образом: $H_2SO_4 + 4H_2 = H_2S + 4H_2O$.

Харитонова же (1950) считает, что если в природе сульфаты обычно находятся в виде солей, то уравнение процесса водородной сульфатредукции должно быть представлено в следующем виде:

$$CaSO_4 + 4H_2 = CaS + 4H_2O$$
$$2CaS + 2H_2O = Ca(HS)_2 + Ca(OH)_2.$$

В 1936 г. Виринга (Wieringa) проверил результаты опытов Фишера, Лиске и Винцера со смешанной культурой и показал, что восстановление CO_2, в CH_4 газообразным H_2 с образованием больших количеств уксусной кислоты связано с загрязнением культуры метанообразующих бактерий спороносной формой — Clostridium aceticum.

Таким образом, выводы Фишера и его сотрудников не получили подтверждения. Метанообразующие бактерии конденсировали CO_2, с молекулярным H_2 до CH_4 без промежуточного вещества в виде уксусной кислоты. Хотя до сих пор еще неясно, не может ли при этом образоваться какое-нибудь промежуточное вещество с одним атомом углерода, как муравьиная кислота, формальдегид или метиловый спирт (наблюдения Стефенсона и Стикленда).

Экспериментальные данные Виринга показали, что Clostridium aceticum был способен образовать уксусную кислоту из $CO_2 + H_2$, но не мог образовать метан.

$$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow 2H_2O + CH_3COOH + 68 \text{ ккал}.$$

(Рабинович, 1951; Wieringa, 1936).

Некоторые же метановые бактерии могли сами сбраживать соли уксусной кислоты до CH_4, но не могли синтезировать его из CO_2 и H_2, так что в смешанной культуре образование CH_4 могло проходить ступенчато — сперва с образованием уксусной кислоты, а потом CH_4.

В дальнейшем было важно выяснить, оказывает ли влияние концентрация CO_2 на скорость ее восстановления молекулярным H_2 до CH_4. Это

[2] Бактериальные клетки промывались 0,9%-ным раствором хлористого натрия или раствором Рингера. Впоследствии эти растворы были заменены раствором из 0,2% хлористого натрия, 0,2% хлористого калия и 0,03% $Na_2S \cdot 9H_2O$, pH = 7,0.

исследование провел Баркер (1943) манометрическим методом в аппарате Варбурга с чистой культурой M. omelianskii, способной образовывать CH_4 из CO_2 и H_2.

Из его опытов можно сделать заключение, что при увеличении концентрации CO_2 уменьшается образование CH_4, так как ослабевает скорость потребления H_2 клетками бактерий.

В 1947 г. Клюйвер и Шнеллен снова провели опыты по образованию CH_4 из CO_2, CO и H_2 в анаэробных условиях с чистыми культурами. Были взяты Methanosarcina barkerii, окисляющая только метиловый спирт и с трудом соли уксусной кислоты до CH_4, Methanobacterium formicicum, потреблявшая только соли муравьиной кислоты с образованием CH_4, чем отличалась от Escherichia formica Стефенсона, которая также образовывала CH_4 и из гексаметилентетрамина и метилового спирта в атмосфере H_2, и третья форма M. omelianskii, разлагающая спирты до соответствующих жирных кислот и в то же время восстанавливающая CO_2 до CH_4.

Результаты опытов показали, что Methanosarcina barkerii способна осуществлять восстановление CO при помощи молекулярного H_2 до CH_4.

Опыты, поставленные для выяснения скорости образования CH_4 из CO, выявили, что процесс протекал ступенчато, как уже отмечалось у Фишера и других:

$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2.$$
$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O.$$

Интересно отметить, что Methanosarcina barkerii могла полностью превратить CO в CO_2 с участием воды при 100%-ной концентрации CO, в то время как для всех других организмов CO оказывалась ядовитой.

M. formicicum вызывала такие же превращения CO, которые могла осуществлять Methanosarcina barkerii, но только при низкой концентрации CO.

M. omelianskii не образовывала CH_4 из CO и молекулярного H_2. Если же бралась смесь газов из CO, CO_2 и H_2, то количество образовавшегося CH_4 соответствовало количеству взятой CO_2, а CO оставалась не потребленной.

Таким образом, было доказано, что CO не являлась промежуточным веществом при восстановлении CO_2 до CH_4, как это предполагалось.

Механизм метанового брожения

Механизм метанового брожения интересовал всех его исследователей.

Омелянский в своих первоначальных опытах показал, что при метановом брожении, происходящем под влиянием «псевдосарцины» и ее спороносных спутников, происходило количественное разложение солей уксусной и масляной кислот по следующим уравнениям:

$$2CH_3COOK + H_2O = K_2CO_3 + CO_2 + 2CH_4.$$
$$(CH_3CH_2CH_2COO)_2Ca + 3H_2O = CaCO_3 + 2CO_2 + 5CH_4.$$

Зенген подтвердил схему метанового брожения, данную Омелянским при исследовании жирных кислот, но оставалось неясным, не образуется ли CH_4 из метильной группы кислот.

Открытие Зенгеном возможности образования CH_4 при восстановлении CO_2 молекулярным H_2, с одновременным окислением H_2 до воды $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ дало возможность ван Нилю (van Niel, 1931) создать следующую теорию механизма метанового брожения. Он считал, что всякое метановое брожение представляет собой восстановление CO_2 или карбоната до CH_4 в присутствии донаторов H_2 органического или неорганического происхождения, т. е. что по существу оно было анаэробным окислительно-восстановительным процессом.

Свою теорию ван-Ниль основывал на аналогичном процессе восстановления сульфатов Vibrio desulfuricans (Баарс, Baars, 1930). При этом процессе молекула органического вещества являлась только донатором H_2, а сульфаты его акцептором и последние восстанавливались до H_2S. Ван-Ниль обобщил эти процессы и дал следующие уравнения:

$$4H_2A + H_2SO_4 \rightarrow 4A + H_2S + 4H_2O$$
$$4H_2A + H_2CO_3 \rightarrow 4A + CH_4 + 3H_2O$$

или

$$4H_2A + CO_2 \rightarrow 4A + CH_4 + 2H_2O$$

H_2A — молекула, способная окисляться — донатор H_2.

A — окисленное, а H_2S и CH_4 — восстановленные соединения.

По теории Нив и Басвелл (Neave a. Buswell, 1930), в метановом брожении вода играет роль окисляющего агента, причем одна часть молекулы субстрата окисляется в то время, как другая часть молекулы восстанавливается атомами H_2 воды до CH_4, т. е., что происходит внутримолекулярная реакция перемещения.

Количество необходимых молекул воды для данной реакции соответствует числу атомов углерода в молекуле кислоты, вошедшей в эту реакцию, и выражается простым отношением $\frac{(n-2)}{2}$.

n представляет число атомов углерода в кислоте. Отсюда можно вывести уравнение общее для кислот:

$$C_nH_{2n}O_2 + \frac{(n-2)}{2}H_2O = \frac{(n+2)}{4}CO_2 + \frac{(3n-2)}{4}CH_4.$$

Например, для пропионовой кислоты оно будет следующее:

$$4C_3H_6O_2 + 2H_2O = 5CO_2 + 7CH_4.$$

Симонс и Басвелл (Symons a. Buswell, 1933) предложили для соединений, состоящих только из C, H_2 и O_2, другое уравнение:

$$C_nH_aO_b + \left(n - \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right)H_2O \rightarrow \left(\frac{n}{2} - \frac{a}{8} + \frac{b}{4}\right)CO_2 + \left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right)CH_4,$$

где — n, a и b указывают число соответствующих атомов C, H_2 и O_2 в исследуемом соединении. Такое уравнение дает возможность рассчитать баланс реакции для веществ, которые полностью превращаются в CO_2 и CH_4.

Баркер видит недостаток теории Нив и Басвелла в том, что авторы ее не дают объяснения образования только одного восстановленного продукта субстрата (CH_4).

В 1931 г. Тайер (Thayer) выдвинул гипотезу, что высшие гомологи ряда жирных кислот в процессе декарбоксилирования должны давать соответствующие кислотам углеводороды (этан, пропан, бутан, пентан и т. д.), так же как уксусная кислота образует CH_4 в метановом брожении. Но все его попытки экспериментально подтвердить выдвинутую им гипотезу потерпели неудачу; в его исследованиях жирные кислоты, от уксусной до стеариновой, давали только CH_4.

Исследования метанового брожения органического вещества обычными методами химического анализа не давали все-таки непосредственного указания на источник происхождения CH_4, и только метод радиоактивного углерода позволил установить прямое доказательство механизма брожения.

Опыты проводились с чистыми культурами M. omelianskii и Methanosarcina methanica (Баркер с сотр., 1940).

Радиоактивный углерод (C^{14}) заключался в CO_2. Результаты опытов с M. omelianskii показали, что почти вся меченая CO_2 восстанавливалась в радиоактивный CH_4. Этиловый спирт окислялся в нерадиоактивную

кислоту, и ее количество было близко к количеству окисленного этилового спирта по формуле $2C_2H_5OH + CO_2 \rightarrow 2CH_3COOH + CH_4 + 21$ ккал (Баркер с сотр., 1940, Рабинович, 1951).

Опыты с Methanosarcina methanica дали такие же результаты, какие получались с M. omelianskii, т. е., что радиоактивная CO_2 восстанавливалась в радиоактивный CH_4 при разложении метилового спирта. Но при таком брожении CH_4 получалось больше, чем могло бы его образоваться из CO_2, вследствие этого авторы исследования сделали предположение, что возможно сам метиловый спирт способен восстанавливаться до CH_4

$$4CH_3OH \rightarrow CO_2 + 3CH_4 + 2H_2O.$$

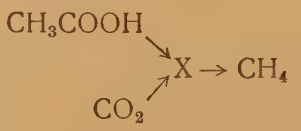
(Баркер с сотр., 1940).

Кроме того, выяснилось, что бактериальные клетки состояли из радиоактивного и нерадиоактивного вещества; таким образом, источником углерода для построения клеток M. omelianskii и Methanosarcina methanica служила меченая CO_2 (около 1,5% общего количества восстановленной CO_2) и этиловый спирт (5—10% от количества разложенного спирта) (Баркер, 1940, 1941).

Дальнейшее изучение метанового брожения солей уксусной кислоты с меченым углеродом C^{14} проводилось с обогащенной культурой метанообразующих бактерий. В культуре находились главным образом микрококки, сарцин не наблюдалось.

Полученные данные показали, что наибольшая часть CH_4 образовалась из метильной группы уксусной кислоты (Басвелл и Соло, 1948; Стадтмен и Баркер, 1949).

Тогда Баркер со своими учениками высказали гипотезу о том, что должно быть какое-то общее промежуточное вещество, объединяющее процессы брожения солей уксусной кислоты до CH_4 и восстановления CO_2 до CH_4 при помощи газообразного H_2, если они происходят под влиянием одних и тех же метанообразующих бактерий, так как трудно себе представить, чтобы у одного и того же организма были бы два совершенно различных механизма для образования CH_4. Таким образом, была предложена следующая схема:



По данной схеме соединение X, из которого образовывался CH_4, было бы одним и тем же соединением при обоих субстратах.

Дальнейшее изучение механизма метанового брожения жирных кислот проводилось с M. suboxydans и с радиоактивной CO_2 (C^{14}). Результаты исследований показали превращение масляной кислоты в уксусную и восстановление $C^{14}O_2$ до CH_4 с радиоактивным углеродом в количестве 70—72%.

1) $2CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O + CO_2 \rightarrow 4CH_3COOH + CH_4.$

Разложение уксусной кислоты не происходило, так как M. suboxydans не могла использовать эту кислоту.

При метановом брожении солей валериановой кислоты в присутствии меченой $C^{14}O_2$ получались пропионовая и уксусная кислоты в эквивалентном отношении к количеству окисленной валериановой кислоты, а ридоактивный CH_4 образовывался из $C^{14}O_2$.

2) $2CH_3CH_2CH_2CH_2COOH + 2H_2O + CO_2 \rightarrow$
$\rightarrow 2CH_3COOH + 2CH_3CH_2COOH + CH_4.$

Летучие кислоты получались нерадиоактивными. Если бралась валериановая кислота с меченым углеродом в β-положении, то меченый углерод наблюдался в карбоксильной группе пропионовой кислоты, уксусная кислота была нерадиоактивна. Метан же образовывался опять только из CO_2, которая не была радиоактивна, как это видно из следующего уравнения:

$$3)\ 2CH_3CH_2C^{14}H_2CH_2COOH + 2H_2O + CO_2 \rightarrow 2CH_3CH_2C^{14}OOH + 2CH_3COOH + CH_4.$$

Опыт длился четыре месяца, и культура оказалась загрязненной десульфурирующими вибрионами.

Изучение брожения солей капроновой кислоты в присутствии уксусной кислоты с радиоактивным углеродом в метильной и карбоксильной группах показало опять, что CH_4 образуется только из CO_2. Капроновая кислота окислялась количественно до масляной и уксусной кислот. Меченый углерод был в летучих кислотах, но не в CO_2 и CH_4.

Брожение солей пропионовой кислоты с радиоактивной $C^{14}O_2$ проводилось с культурой M. propionicum. Опыт продолжался 52 дня. За это время почти все количество солей пропионовой кислоты окислилось в соли уксусной кислоты.

$$4)\ 4CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 4CH_3COOH + CO_2 + 3CH_4.$$

Можно себе представить и такую реакцию:

$$5)\ CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 6H.$$

Оставшаяся пропионовая кислота и полученная уксусная содержали радиоактивный углерод (C^{14}). Это могло быть лишь в том случае, если меченые соли пропионовой кислоты произошли из меченых солей уксусной кислоты, а соли уксусной кислоты образовались из меченой CO_2. Таким образом, здесь происходила обратимая реакция.

Радиоактивный углерод находился в молекуле пропионовой кислоты в α- и β-положениях и, кроме того, в ее карбоксильной группе, из которой получалась $C^{14}O_2$ по пятому уравнению. CH_4 опять происходил исключительно из CO_2, что подтверждало теорию ван-Ниля.

Проведенные опыты с Methanosarcina barkerii[3] и радиоактивным углеродом в метильной группе уксусной кислоты дали такие же результаты, какие уже описаны выше с культурой микрококков (Стадтмен и Баркер, 1949), т. е. все количество образовавшегося CH_4 произошло из меченой метильной группы уксусной кислоты. Опыты были длительные, так как Methanosarcina barkerii развивалась очень слабо на солях уксусной кислоты. Газ не выделялся четыре-шесть недель. Следующие опыты, поставленные с той же сарциной, но с метиловым спиртом и меченой $C^{14}O_2$, показали, что почти весь CH_4 (98%) образовался из метилового спирта, а незначительная его часть из CO_2. Это согласовалось с последними данными (Басвелл с сотр. 1948; Стадтмен и Баркер, 1949) и противоречило прежним выводам (Баркер с сотр., 1940). Расхождение в полученных результатах следует объяснить, пишут Стадтмен и Баркер, или коротким периодом полураспада меченого углерода C^{14} или еще неопытностью исследователей в обращении с радиоактивным углеродом в 1940 г.

Однако, основываясь на литературных данных, можно видеть, что причина этого разногласия заключается в том, что авторы работали с различными организмами.

---

[3] В колониях сарцины иногда можно было наблюдать несколько клеток длинной, нитеобразной, подвижной, спороносной палочки, дальнейшее очищение культуры не было проведено, потому что метановая сарцина развивалась очень медленно (Стадтмен и Баркер, 1951 b.).

Вышеуказанные данные позволили Стадтмен и Баркеру (1951) высказать предположение, что при получении CH_4 из метильных групп уксусной кислоты и метилового спирта образуются какие-то гипотетические промежуточные вещества X и У. Эти вещества являются связующими звеньями между метановым брожением уксусной кислоты и метилового спирта и процессом восстановления CO_2 водородом до CH_4.

Следующая схема иллюстрирует сказанное.

$$\begin{array}{l} CH_3COOH \rightarrow X \rightarrow CH_4 \\ \qquad\qquad\quad \uparrow \\ CH_3OH \rightarrow Y \rightleftarrows CO_2 \end{array}$$

X и У могут быть соединения с несколькими атомами углерода, так как испытанные соединения с одним атомом углерода (CO, HCOOH, HCHO) не могли быть восстановлены непосредственно в метан.

Согласно данной схеме, предполагается один общий механизм образования CH_4 для CO_2, метилового спирта и уксусной кислоты. Схема основана на нижеследующих наблюдениях.

1. Methanosarcina barkerii являлась единственной метанообразующей бактерией, которая могла превращать в CH_4 соли уксусной кислоты, метиловый спирт и CO_2 (Шнеллен, Schnellen, 1947).

2. Метильная группа солей уксусной кислоты превращалась в CH_4 и только незначительная часть CH_4 получалась из CO_2 (Стадтмен и Баркер, 1949).

3. Метиловый спирт легко превращался в CH_4 и CO_2.

4. CO_2 восстанавливалась до CH_4 теми чистыми культурами бактерий, которые не использовали ни соли уксусной кислоты, ни метилового спирта (Баркер, 1941, Стадтмен и Баркер, 1949).

Для большей наглядности основные свойства метанообразующих бактерий представлены в виде таблицы.

* * *

Образование CH_4 под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов составляет один из важных разделов современной общей микробиологии. Мы должны отметить с чувством глубокого удовлетворения и гордостью, что в этой области знания В. Л. Омелянскому принадлежит выдающаяся роль. Он внес в нее новые идеи и блестяще разрешил ряд вопросов.

Им впервые показано, что этиловый спирт в анаэробных условиях подвергается метановому брожению, и описан возбудитель этого брожения, названного впоследствии Баркером Methanobacterium omelianskii. Исследования Омелянского показали также, что метановому брожению под влиянием микроорганизмов подвергаются соли различных органических веществ. Своими работами он стимулировал дальнейшие исследования в этом направлении как у нас в СССР, так и за рубежом.

Другими исследователями особенно много внимания было уделено получению чистых культур метанообразующих бактерий [4] и выяснению механизма процесса метанового брожения.

Способность образовывать CH_4 из солей жирных кислот, различных спиртов и из CO_2 или CO с молекулярным H_2 была подтверждена при работе с чистыми культурами.

---

[4] Выделение чистых культур проводилось на минеральной агаровой среде, лишенной кислорода и разлитой по пробиркам высоким слоем для создания анаэробных условий. Посевной материал из накопительных культур вносился прямо в среду, где тщательно перемешивался, и после этого переносился в ряд пробирок в уменьшающемся количестве, причем по возможности содержимое пробирок не допускалось до соприкосновения с воздухом. Таким образом, удавалось получить отдельно стоящие друг от друга колонии и выделить из них чистые культуры метановых бактерий.

Метанообразующие микроорганизмы

Характеристика вида	Образование CH_4 из различных веществ в анаэробных условиях	Иследованные вещества, непригодные для образования CH_4 в анаэробных условиях	Литературные источники
1. Methanobacterium söhngenii n. sp. Клетки палочковидные, прямые или слабоизогнутые, неподвижные, неспороносные. Обычная их величина 5—7 $\mu \times 0{,}3$—$0{,}5\ \mu$, часто соединяются в нити значительной длины. Нити иногда принимают характерную для данного вида форму клубков. Бактерии погибают при $+60°$. Клетки хорошо красятся анилиновыми красками. По Граму не окрашиваются. Анаэроб	Соли кислот: муравьиной уксусной масляной капроновой каприловой каприновой Смесь углекислоты и водорода	Соли кислот: пропионовой валериановой энантовой пеларгоновой Спирты: этиловый	Зенген, 1910, 256 стр.; Баркер, 1936b, 435 стр; Клюйвер и ван-Ниль, 1936, 399 стр.
К этому виду относятся: а) термофильная метановая бактерия, выделенная Coolhaas. Очень тонкие палочки от 3 до 6μ длины, часто образующие нити. Анаэроб	Соли кислот: муравьиной уксусной пропионовой (медленное) масляной (очень медленное) изомасляной щавелевой молочной глюконовой Соли кислот: уксусной масляной Кетоны: ацетон		Коольхаас, 1928, 163 стр.; Баркер, 1936, 436 стр.;
б) метановая бактерия, изученная Wiken			Викен, 1940
2. Methanobacterium omelianskii n. sp. Очень тонкие, довольно длинные, слабо изогнутые, неподвижные и неспороносные палочки. Нити образуются редко и очень короткие. Палочки грамотрицательные. Анаэроб	Спирты: этиловый пропиловый изопропиловый бутиловый изобутиловый амиловый Смесь углекислоты и водорода	Соли кислот: муравьиной уксусной пропионовой масляной валериановой молочной маллоновой янтарной Спирты и углеводы: метиловый глицерин маннит глюкоза Смесь окиси углерода и водорода дрожжевой автолизат	Омелянский, 1916; Баркер, 1936, 1937, 1941, 1943; Баркер, Рубен и Камен, 1940; Викен, 1940; Клюйвер и Шнеллен, 1947; Стадтмен и Баркер, 1949
К данному виду относится вторая метановая бактерия, выделенная Wiken	Соли кислот: муравьиной Спирты: пропиловый		Викен, 1940;

Продолжение

Характеристика вида	Образование CH_4 из различных веществ в анаэробных условиях	Исследованные вещества, непригодные для образования CH_4 в анаэробных условиях	Литературные источники
3. Methanobacterium formicum (Escherichia formica) Короткие, подвижные, неспороносные палочки. Грамотрицательные. Образуют ферменты: гидрогеназу и гидрогенлиазу. Развиваются в аэробных и анаэробных условиях. На минеральных средах рост слабее, чем на мясопептонных, особенно при добавлении к ним различных углеводов. Восстанавливают SO_4 до H_2S при помощи H_2	В атмосфере водорода: Соль муравьиной кислоты формальдегид спирт метиловый гексаметилентетрамин углекислота или окись углерода	Соединения с большим числом атомов углерода, чем один	Стефенсон и Стикленд, 1931, 1932 и 1933; Баркер, 1936b
4. Methanobacterium formicum n. sp. Описание вида в докторской диссертации Schnellen (1947)	Соли кислот: муравьиной Смесь окиси углерода с водородом или водой	Соли других жирных кислот	Шнеллен, 1947; Клюйвер и Шнеллен, 1947
5. Methanobacterium suboxydans n. sp. Тонкие, нежные, слабоизогнутые палочки различной длины; в старых культурах с трудом отличаются от вибрионов. Палочки подвижные, но их движение значительно медленнее, чем у вибрионов. Клетки часто содержат много зернышек. Они грамположительные, с возрастом культуры изменяется их отношение к окраске по Граму. Образование спор сомнительно. Неполное окисление жирных кислот. Анаэроб	Соли кислот: масляной валериановой капроновой энантовой	Соли кислот: уксусной пропионовой	Стадтмен и Баркер, 1951a
6. Methanobacterium propionicum n. sp. Короткие, относительно толстые палочки или коккообразные бактерии в виде свободных клеток и парами. Очень активно подвижные. В жидких культурах образуют помутнение. Клетки окрашиваются полярно эритрозином и метиленовой синью. Грамположительные. Повидимому, имеются центрально расположенные споры, без раздувания клеток. Неполное окисление пропионовой кислоты	Соли кислот: пропионовой		Стадтмен и Баркер, 1951a
7. Methanococcus mazei n. sp. Клетки мелкие, сферические, одиночные, иногда образуют группы, окруженные слизистой капсулой. Неподвижные, неспороносные. Окраска по Граму изменчивая	Соли кислот: уксусной масляной	Спирты: этиловый бутиловый	Мазе, 1915, Баркер, 1936b

Продолжение

Характеристика вида	Образование CH_4 из различных веществ в анаэробных условиях	Исследованные вещества, непригодные для образования CH_4 в анаэробных условиях	Литературные источники
К этому виду относятся: а) кокк, изученный Groenewege	Соли кислот: уксусной		Баркер, 1936b
б) кокк, описанный Wiken	Соли кислот: масляной Кетоны: ацетон		Викен, 1940
8. Methanococcus vannielii n. sp. Сферические клетки кокка в жидкой культуре различного диаметра от 0,5 до 4 μ. Средний их размер 1—2 μ. Встречаются и слабо эллиптической формы. В старых культурах парные клетки часто бывают разной величины. Кокки, выделенные из глубинных колоний агара, вначале имеют неправильную форму, но быстро принимают сферическую. Оболочка клеток легко разрушается при высушивании микроскопических препаратов или при центрифугировании культур. Клетки микроорганизма в суспензии, высушенные в эксикаторе над хлористым кальцием, сохраняют свою жизнеспособность в течение продолжительного времени (наблюдения через $1^1/_2$ года). Кокки очень подвижны, они движутся по спирали. Анаэроб	Соли кислот: муравьиной Смесь углекислоты и водорода	Соли кислот: уксусной пропионовой масляной янтарной Спирты: метиловый этиловый Углеводы: глюкоза	Стадтмен и Баркер, 1951 c
9. Methanosarcina methanica (Smit) Kluyver a. van Niel Большие сферические клетки, неподвижные и неспороносные, образующие пакеты величиной 8—10 μ, тетрады, редко диплококки. Грамизменчивы	Соли кислот: уксусной масляной (возможно) Спирты: метиловый	Спирты: этиловый	Зенген, 1910; Баркер, 1936; Клюйвер и ван Ниль, 1936; Баркер, Рубен и Камен, 1940
К этому виду следует отнести сарцину, выделенную Wiken	Соли кислот: уксусной пропионовой масляной		Викен, 1940
10. Methanosarcina barkerii n. sp. Крупные кокки образуют типичные пакеты клеток. В жидких культурах пакеты представляют собой большие зооглейные массы. Анаэроб. Сарцина подобна организму, изолированному Schnellen в 1947 г.	Соли кислот: уксусной (с трудом) Спирты: метиловый Смесь окиси углерода с водородом или с водой	Соли других органических кислот Другие спирты	Шнеллен, 1947; Клюйвер и Шнеллен, 1947; Стадтмен и Баркер, 1951b

Установлено происхождение углерода бактериальных клеток из сбраживаемых органических соединений и из CO_2.

Химическими анализами продуктов брожения было показано, что количество восстановленной CO_2 эквивалентно количеству образовавшегося CH_4.

CO не являлась промежуточным соединением при восстановлении CO_2 до CH_4, так как CO сперва окислялась H_2O до CO_2 с выделением H_2, а уже потом CO_2 восстанавливалась H_2 до CH_4.

Применение радиоактивного углерода дало возможность установить механизм метанового брожения. Так, если исследования проводились с этиловым спиртом, меченой углекислотой ($C^{14}O_2$) и с чистой культурой M. omelianskii, то вся CO_2 восстанавливалась в радиоактивный CH_4, а спирт в уксусную кислоту. Последняя не была радиоактивна, что показывало, что она не являлась промежуточным соединением между меченой CO_2 и меченым CH_4.

Такое же образование CH_4 из CO_2 получалось при разложении солей жирных кислот, кроме солей уксусной кислоты. Если же брались соли уксусной кислоты или метиловый спирт, меченая углекислота ($C^{14}O_2$) и чистая культура Methanosarcina barkerii, то CH_4 образовывался почти целиком из метильной группы уксусной кислоты или метилового спирта.

Таким образом, исследователи пришли к заключению, что метановое брожение солей уксусной кислоты и метилового спирта под влиянием Methanosarcina barkerii существенно отличается от метанового брожения других веществ.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Получено 7.VII.1951 г.

ЛИТЕРАТУРА

Аристовская Т. В. Значение углекислоты в жизнедеятельности гетеротрофного микроорганизма (Обзор). Успехи совр. биол., XVII, 54, 1944.

Беляева М. И. Физиология и экология водородных бактерий. Диссертация. 1950. Биб-ка Отделения биологических наук АН СССР.

Коникова А. С. и Крицман М. Г. Применение метода меченых атомов в микробиолгии (Обзор). Микробиология, XX, 58, 1951.

Красина Н. Н. Физиология бактерий, разлагающих муравьиную кислоту с образованием газа. Микробиология, V, 669, 1936.

Омелянский В. Л. Über die Zersetzung der Ameisensäure durch Mikroben. Ztbl. Bact., II, XI, 177, 256, 1903.

Омелянский В. Л. О выделении метана в природе при биологических процессах. Арх. биол. наук, XII, вып. 2, 1905.

Омелянский В. Л. Fermentation méthanique de l'alcohol éthylique. Ann. Inst. Past., 30, 56, 1916.

Попов Л. Pflügers Arch. Hyg., X, 113, 1875. (цит. по Омелянскому, Арх. биол. наук, XII, 1905).

Рабинович Е. Фотосинтез. Изд-во иностр. лит-ры, М., 1951.

Симакова Т. Л. Микрофлора, вызывающая разложение органического вещества в метан-тэнках. Микробиология, IX, 845, 1940.

Харитонова Л. П. Микробиологическое восстановление сульфатов и образование сульфидов с использованием молекулярного водорода. Диссертация. 1950. Биб-ка Отделения биологических наук АН СССР.

Barker H. A. On the biochemistry of methane fermentation. Arch. Microb., 7. 404, 1936a.

Barker H. A. Studies upon the methane-producing bacteria. Arch. Microb., 7, 420, 1936b.

Barker H. A. The production of capronic and butyric acids by methane fermentation of ethyl alcohol. Arch. Microb., 8, 415, 1937.

Barker H. A. Studies on the methane fermentation. V. Biochemical activities of Methanobacterium Omelianskii. J. Biol. Chem., 137, 153, 1941.

Barker H. A. Studies on the methane fermentation. VI. The influence of CO_2 concentration on the rate of CO_2 reduction by molecular H_2. Proc. Nat. Acad. Sci. 29, 184, 1943.

Barker H. A. Le métabolisme des gaz par les bactéries anaérobies. Ann. Inst Pasteur, 77, 361, 1949.

Barker H. A., Ruben S. a. Kamen M. D. The reduction of radioactive CO_2 by methane-producing bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci., **26**, 426, 1940.
Breden C. R. a. Buswell A. M. The use of shredded Asbestos in methane fermentation. J. Bact., **26**, 379, 1933.
Buswell A. M. a. Sollo F. W. The mechanism of the methane fermentation. J. Am. Chem. Soc., **70**, 1778, 1948.
Coolhaas C. Zur Kenntnis der Dissimilation Fettsaurer Salze und Kohlenhydrate durch thermophile Bakterien. Ztbl. Bact., Abt. II, **75**, 161, 1928.
Fischer F., Lieske R. u. Winzer K. Biologische Gasreaktion. I. Die Umsetzungen des Kohlenoxyds. Biochem. Z., **236**, 247, 1931.
Fischer F., Lieske R. u. Winzer K. Biologische Gasreaktion. II. Über die Bildung von Essigsäure bei der biologischen Umsetzung von Kohlenoxyd und von Kohlensäure mit Wasserstoff zu Methan. Biochem. Z., **245**, 2, 1932.
Heukelekian H. a. Heinemann B. Studies on the methaneproducing bacteria. Sew. Work. J., **11**, 426, 571, 1939.
Hoppe-Seyler F. Die Methangährung der Essigsäure. Z. physiol. Chem., **11**, 561, 1887.
Kluyver A. J. a. van Niel C. B. Prospects for a natural system of classification of bacteria. Ztbl. Bact., Abt. II, **94**, 369, 1936.
Kluyver A. J. a. Schnellen Ch. G. On the fermentation of carbon monoxide by pure cultures of methane bacteria. Arch. Biochem., **14**, 57, 1947.
Mazé P. Sur la fermentation forménique et le ferment qui la produit. C. R., **137**, 887, 1903.
Mazé P. Ferment forménique. Fermentation forménique de l'acétone. Procédé de culture simple du ferment forménique. C. R. Soc. Biol., **78**, 398, 1915.
Neave S. L. with Buswell A. M. The anaerobic oxidation of fatty acids. J. Amer. Chem. Soc., **52**, 3308, 1930.
van Niel C. B. On the morphology and physiology of the purple and green sulfur bacteria. Arch. Microb., **3**, 1, 1931.
Schnellen Ch. G. Onderzoekingen over de Methangisting. Dissertation. Delft., 1947 [цит. по Kluyver a. Schnellen, Arch. Biochem., **14**, 1947).
Stadtman Thr. C. a. Barker H. A. Studies on the methane fermentation. IX. The chim. des Pays-Bas et de la Belgique, **29**, 238, 1910.
Stadtman Thr. C. a. Barker H. A. Studies on the methane fermentation. VII. Tracer experiments on the mechanism of methane formation. Arch. Biochem., **21**, 256, 1949.
Stadtman Thr. C. a. Barker H. A. Studies on the methane fermentation. VIII. Tracer experiments on fatty acid oxidation by methane bacteria. J. Bact., **61**, 67, 1951a.
Stadtman Thr. C. a. Barker H. A. Studies on the methane fermentation. IX. The origin of methane in the acetate and methanol fermentation by methanosarcina. J. Bact., **61**, 81, 1951b.
Stadtman Thr. C. a. Barker H. A. Studies on the methane fermentation. X. A new formate-decomposing bacterium, Methanococcus vannielii. J. Bact., 62, 269, 1951c.
Stephenson M. a. Stickland L. H. XXVII. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. The properties of the enzyme. Biochem. J., **25**, 205, 1931.
Stephenson M. a. Stikland L. Hydrogenlyases. Bacterial enzymes liberating molecular hydrogen. Biochem. J., **26**, 712, 1932.
Stephenson M. a. Stickland L. H. Hydrogenase. III. The bacterial formation of methane by the reduction of one carbon compounds by molecular hydrogen. Biochem. J., **27**, 1517, 1933.
Symons G. E. u. Buswell A. M. The methane fermentation of carbohydrates. J. Am. Chem. Soc., **55**, 2028, 1933.
Tarvin D. a. Buswell A. M. The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. J. Amer. Chem. Soc., **56**, 1751, 1934.
Thayer L. A. Bacterial genesis of hydrocarbons from fatty acids. Bull. Amer. Ass. Petroleum Geol., **15**, 441, 1931.
Volta A. 1776. (цит. по Омелянскому, Арх. биол. наук, XII, 1905).
Wieringa K. T. Antonia van Leeuwenhoek, 3, 1, 1936; **6**, 251, 1940 (цит. по Kluyver a. Schnellen, Arch. Biochem., **14**, 1947).
Wiken T. Untersuchungen über Methangärung und die dabei wirksamen Bakterien. Arch. Microbiol., **11**, 312, 1940.

РЕФЕРАТЫ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Kutzenok A. and Aschner M. **Degenerative process in a strain of Clostridium butylicum.** (Процесс дегенерации у штаммов Cl. butylicum). J. of Bact., v. 64, № 6, pp. 829—836, 1952.

Описывается явление дегенерации штаммов Cl. butylicum при выращивании их в лабораторных условиях.

Штаммы Cl. butylicum, выделенные из почв Иерусалима, выращивались на питательной среде следующего состава: водопроводная вода, пептон — 0,5% пектиновые вещества («marmite») — 1%, глюкоза — 3%. Для изучения колоний служила эта же среда с 2% агара.

Выделенные штаммы не обнаруживали заметных физиологических изменений после 6—10 пассажей на указанной среде, но затем ферментация падала, бактерии становились нежизнедеятельными и на 15—18-м пассаже погибали, при этом в культурах исчезали клостридиальные формы, в клетках отсутствовали полисахариды.

Дегенерация ускорялась если единственным источником азота в среде был $(NH_4)_2SO_4$, подавление культуры наступало на 3-м пассаже, а полная гибель на 5-м, такое же действие оказывало подкисление среды фенолом и добавка к среде NaCl.

На плотной среде посев нормально ферментирующих клеток давал гладкие колонии, дегенерирующие клетки образовывали складчатые колонии. По своим серологическим свойствам дегенеративные формы значительно отличались от нормальных.

Е. Рубан

Kauffmann I., Toussaint P. et Boquel G. **Sur le pouvoir fixateur de l'azote atmosphérique des terres de régions tropicales.** (Об азотфиксирующей способности почв тропических стран). Ann. Inst. Pasteur, t. 83, № 5, pp. 713—718, 1952.

Изучалось значение количества засеваемой в питательную среду почвы для эффекта фиксации атмосферного азота. Опыты велись на жидких средах. Исследовались образцы лесных почв Слонового Берега. Было установлено, что развитие фиксаторов атмосферного азота начинается только после засева определенного количества почвы. Это минимальное количество почвы авторы называют «пусковым порогом» (seuil de démarrage). Фиксация азота микроорганизмами зависит от количества и типа засеянной почвы и от степени аэрации питательной среды. Пусковой порог для образцов лесных почв под лесом и лесных почв, в течение года лишенных растительности, увеличивается соответственно усилению аэрации питательной среды. Для уже давно не имевших растительности почв аэрация среды практически не влияет на пусковой порог и на количество фиксированного азота. Количество фиксированного азота мало зависит от содержания в почве органического азота и углерода и от ее обсемененности фиксаторами азота. Незначительное добавление аммонийных солей азота и нитритов в бедные фиксаторами азота почвы уменьшает пусковой порог.

А. Кривиский

Gamble S., Mayhew C. and Chappel W. **Respiration rates and plate counts for determining effect of herbicides on heterotrophic soil microorganisms.** (Измерение интенсивности дыхания и количественный учет на чашках как метод для определения действия гербисидов на гетеротрофные почвенные микроорганизмы). Soil Science, v. 74, № 5, pp. 347—351, 1952.

Пробы почвы для исследования были взяты из поверхностного горизонта нескольких участков поля, обработанных следующими гербисидами: динитро-орто-вторичный бутилфенол (3 фунта/акр); 3(пара-хлорфенил) 1,1-диметил мочевина (2 фунта/акр); орто-хлор-фенол-сульфонил фторид (20 фунтов/акр); натрий 2,4-дихлорфеноксиэтил сульфат (2 фунта/акр) и изопропил-*n*-фенил карбамат (20 фунтов/акр).

Пробы почвы исследовались спустя 1 и 3 месяца после обработки поля гербисидами.

Почва представляла собой мелкий суглинок. Опыты по измерению интенсивности дыхания проводились в аппарате Варбурга. В каждый сосуд помещалось по 1,5 г почвы и прибавлялось по 1 мл 0,01 М раствора глюкозы и по 1 мл 0,02 М раствора K_2HPO_4. Контролями служили пробы почвы, помещенные в сосуды с 2 мл воды, и пробы почвы, не обработанной гербисидами. Для поглощения CO_2 служила фильтровальная бумага, смоченная раствором КОН и помещенная во внутренний цилиндр в сосуде. Опыт продолжался $2^1/_2$ часа при 37°.

Исследования показали, что денитро-орто-вторичный бутилфенол и орто-хлорфенол-сульфонил фторид оказывают подавляющее действие на интенсивность дыхания через один и через три месяца после обработки ими почвы.

Натрий 2,4-дихлорфенокси-этил-сульфат, 3 (пара-хлорофенил) 1,1 диметил мочевина и изопропил-*n*-фенол карбамат не подавляют интенсивности дыхания.

Количественный учет гетеротрофных микроорганизмов производился путем подсчета колоний, выросших после посевов проб почвы на чашки, залитые агаризованной почвенной вытяжкой с глюкозой и K_2HPO_4.

Результаты исследований показали такую же закономерность, что и измерения интенсивности дыхания, кроме изопропил-*n*-фенил карбамата, который, не подавляя интенсивности дыхания, резко снижал число бактерий. Это обстоятельство объясняется способностью данного вещества легко декарбоксилироваться.

Авторы пришли к заключению, что измерение интенсивности дыхания гетеротрофных микроорганизмов в пробах почвы манометрическим методом с одновременным количественным учетом бактерий чашечным методом представляет собой удобный способ для определения подавляющего действия некоторых гербисидов на развитие гетеротрофной почвенной микрофлоры.

Е. Рубан

Quastel I., Scholefield P. and Stevenson I. **The isolation of Bacteria from soil perfused with pyruvic acid oxime** (Выделение бактерий из заливных почв при помощи оксима пировиноградной кислоты). The Biochem. J., v. 51, No. 2, pp. 284—286, 1952.

Изучалась способность изолированных из заливных почв бактерий к усвоению оксима пировиноградной кислоты, сопровождаемому выделением свободных нитритов. 2 г почвенных комочков суспензировалось в 6 мл стерильной дестиллированной воды; 0,1 мл надосадочной жидкости засевалось в синтетическую агаровую среду, содержавшую в качестве единственного источника усвояемого углерода и азота оксим пировиноградной кислоты. После 72-часового культивирования при 37° изолировались чистые культуры и подвергались подробному изучению. Оказалось, что выделенные культуры относятся к роду Achromobacter (3 вида) и к роду Corynebacterium (1 вид). Ни один из выделенных штаммов не мог быть идентифицирован с видами, описанными в определителе Берджи (1948). Авторы дают подробное описание полученных культур. Обнаруженная у изученных в настоящем сообщении микроорганизмов способность окислять оксим пировиноградной кислоты до нитритов, повидимому, не очень широко распространена среди гетеротрофов; контрольная проверка 22 видов банальных культур показала, что большинство этих штаммов неспособно развиваться на данной синтетической среде, и ни один из этих штаммов не образует нитритов из оксима пировиноградной кислоты.

Опыты по адаптации неспособных к усвоению оксима пировиноградной кислоты видов показали, что после 6 пересевов на агаре с оксимом два вида Achromobacter приобрели способность к выделению очень небольшого количества нитритов. Не удалось адаптировать другие виды.

А. Кривиский

Elias Melin and Harald Nilson. **Transport of labelled nitrogen from an ammonium source to pine seedlings through mycorrhizal mycelium.** (Перенос меченого азота от источника аммония к сеянцам сосны посредством мицелия микориз). Svensk Botanisk Tidskrift, Bd. 46, H. 3—4, pp. 281—285, 1952.

Авторами доказан перенос азота микоризообразующим грибом Boletus variegatus в микоризные корешки сеянцев сосны Pinus silvestris. Работа проводилась со стабильным изотопом N^{15}. Методика эксперимента: в широкогорлую колбу Эрленмейера емкостью 500 мл (стекло Пирекс) насыпался промытый крепкой соляной кислотой песок в количестве 160 г на колбу. В песок, около стенки колбы, помещалась стеклянная чашечка диаметров 3,5 см и высотой 1,8 см. Песок увлажнялся раствором питательных солей (из расчета 1 мл на 4 г песка) следующего состава: KH_2PO_4—0,5 г, $CaCl_2$ — 0,05 г; NaCl — 0,025 г; $MaSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,15 г; $(NH_4)_2HPO_4$ — 0,25 г: лимоннокислого железа (1%) — 1,2 мл; тиамина — 15 μг и дестиллированной воды — 1 л.

Стерилизация проводилась при 120° в течение 15 минут. В колбу вносилось по одному асептированному сеянцу Pinus silvetris, а в чашечку, спустя некоторое время, мицелий гриба Boletus variegatus. Мицелий, развиваясь перерастал через край ча-

шечки и по истечении двух месяцев образовывал на корнях сеянцев хорошо развитую микоризу. После образования микоризы в чашечку с мицилием добавлялся изотоп N^{15} (с атомным процентом 45,2) в виде раствора NH_4NO_3 в количестве от 0,5 мг до 10 мг. Через два дня мицелий отрезался от края чашечки, стебель, иглы и микоризные и немикоризные корешки (отмытые от нитрата) высушивались при 100° в течение 24 часов.

Определялось общее количество азота по Кьельдалю, причем аммиак отгонялся в соляную кислоту. Полученный отгон делили на два образца. Один образец шел для определения общего количества азота, второй — употреблялся для определения N^{15}. Ввиду того, что сернокислый аммоний более удобен для определения на масспектрографе, находящийся во втором образце хлористый аммоний переводили в сернокислый аммоний. Результат определения N^{15} представлен в таблице. Приводим данные при дозе N^{15} 10 мг.

Части растения	Сухой вес в мг	Общее количество N в мг	Общее количество N^{15} в γ	Избыток N^{15} в γ	Относительные величины
Немикоризные корешки	68	1,92	8,8	1,5	22
Микоризные корешки .	10	0,28	2,3	1,2	120
Ствол	86	2,42	11,0	1,8	21
Иглы	64	1,52	6,3	0,5	9

Относительные величины вычислены по формуле:

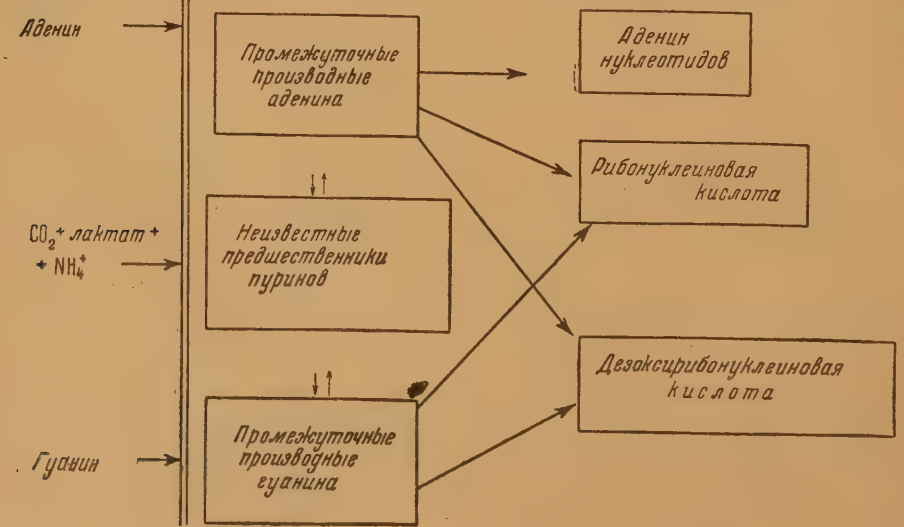
$$\frac{\text{избыток атомных процентов}}{\text{сухой вес}} \times N^{15} \times 1000$$

Высокое содержание N^{15} в микоризных корешках авторы объясняют способностью гриба Boletus variegatus, образующего микоризу с сеянцами сосны, передавать азот из раствора аммонийных солей в ткани корня сосновых сеянцев.

Н. Шемаханова

Koch A. L., Putman F. W., Evans T. A. **The purine metabolism of Escherichia coli.** (Пуриновый обмен у E. coli). J. Biol. Chem., v. 197, pp. 105—112, 1952.

Изучалось участие CO_2 в синтезе пуринов, а также ассимиляция готовых пуринов в интенсивно растущих культурах E. coli. Бактерии выращивались при сильной аэрации на средах, в которые добавлялась углекислота меченая радиоактивным углеродом $C^{14} — C^{14}O_2$, или пурины — аденин и гуанин, содержащие меченый углерод.



После достижения культурами фазы логарифмического роста бактериальные тела осаждались центрифугированием. Осадок бактерий отмывался от C^{14} и подвергался анализу. Из клеток изолировалась пуриновая фракция нуклеиновых кислот и пурины осаждались в виде серебряных солей. Отдельные пуриновые основания изолировались при помощи хроматографии и в них определялось содержание C^{14}. Анализы показали, что при выращивании E. coli в присутствии $C^{14}O_2$ C^{14} накапливается в большом количестве в аденине и гуанине. В гуанине 94% C^{14} вошло в положение шестого углеродного атома, пуринового ядра.

При росте E. coli на средах, содержащих меченые аденин или гуанин, оказалось что E. coli может использовать полностью молекулы этих веществ для построения нуклеиновых кислот. Если давать в среду меченый аденин, то в нуклеиновых кислотах клеток появляется не только меченый аденин, но и меченый гуанин в равных количествах и наоборот. Этот факт свидетельствует о способности E. coli к взаимопревращению пуриновых оснований. Превращение гуанина в аденин происходит более медленно, чем обратная реакция.

Свои данные авторы суммируют в приведенной схеме пуринового обмена E. coli.

Ю. Сорокин

King T. E., Cheldelin V. H. **Oxidative dissimilation in Acetobacter suboxydans.** (Окислительный распад у A. suboxydans). J. Biol. Chem., v. 198, pp. 127—133, 1952. (Сопряженное и не сопряженное с фосфорилированием окисление у Acetobacter suboxydans). J. Biol. Chem., v. 198, pp. 135—141, 1952.

Изучался механизм окислительных процессов у одного из производственных видов уксуснокислых бактерий — Acetobacter suboxydans. Опыты проводились со взвесями покоящихся клеток. Для получения взвесей культура A. suboxydans центрифугировалась, и осадок несколько раз промывался центрифугированием. Затем бактериальная масса замораживалась и в таком состоянии высушивалась в вакууме. По мере надобности из этого высушенного осадка приготавливались взвеси покоящихся клеток. Манометрические опыты проводились в аппарате Варбурга.

Взвесь клеток A. suboxydans окисляет глицерин с потреблением четырех молекул O_2 на одну молекулу глицерина, а дигидроксиацетон — с потреблением трех молекул O_2. Такие соотношения указывают на то, что, повидимому, глицерин окисляется через стадию дигидроксиацетона. Молочная и пировиноградная кислоты окисляются до уксусной кислоты и CO_2. Выявить участие компонентов цикла Кребса в окислительном обмене A. suboxydans авторам не удалось: лимонная α-кетоглютаровая и янтарная кислоты не окислялись взвесью клеток; взвесь не катализировала ацетилирование сульфаниламида и щавелево-уксусной кислоты даже в присутствии факторов ацетилирования коэнзима «А» и АТФ, хотя и установлено, что коэнзим «А» играет существенную роль в обмене A. suboxydans.

При более детальном изучении окисления глицерина и дигидроксиацетона взвесью клеток было обнаружено, что в процессе отмывания клеток центрифугированием бо́льшая часть окислительной способности клеток исчезает. Однако исчезнувшую активность можно восстановить добавлением минерального фосфата и дифосфопиридиннуклеотида (DPN). В связи с этим наблюдением было исследовано влияние PO_4''' и DPN на окислительную активность покоящихся клеток A. suboxydans. Оказалось, что при недостатке как DPN, так и PO_4''' глицерин окисляется до дигидроксиацетона, а этиловый спирт — до уксусной кислоты, откуда следует, что DPN и PO_4''' не являются необходимыми участниками этих этапов окисления. Добавление DPN и PO_4''' вызывает дальнейшее окисление дигидроксиацетона.

Таким образом, первый этап окисления глицерина и этилового спирта не сопряжен с фосфорилированием, что подтверждается опытами с применением 2—4-динитрофенола (ДНФ). Эти опыты показали, что ДНФ не тормозит окисление глицерина в дигидроксиацетон, задерживая полное окисление этих веществ. Более того, оказалось, что A. suboxydans использует энергию первого этапа окисления глицерина без участия фосфата: ДНФ не тормозит развитие культур A. suboxydans в том случае, если последние выращиваются на глицерине или на этиловом спирте.

Авторы заключают, что у A. suboxydans имеются два пути окисления: сопряженное с фосфорилированием и не зависящее от фосфорилирования. Механизм использования энергии окисления без участия фосфата неясен.

Ю. Сорокин

Ajl S. J. **Factors affecting oxidation of acetate by Bacterium coli** (Факторы, влияющие на окисление ацетата Bacterium coli). J. Gen. Microbiol., v. 7, pp. 221—232, 1952.

Имеется ряд доказательств в пользу того, что уксусная кислота окисляется бактериями до CO_2 и H_2O путем конденсации двух молекул CH_3COOH в янтарную кислоту и последующего ступенчатого окисления янтарной кислоты через цикл дикарбоновых кислот по схеме:

$2CH_3COOH \rightarrow$ янтарная $\rightarrow$ фумаровая $\rightarrow$ яблочная $\rightarrow$ щавелевоуксусная $\rightarrow$ пировиноградная $\rightarrow CH_3COOH$.

В настоящей работе исследовались детали механизма окисления уксусной кислоты, а также некоторые факторы, влияющие на это окисление. Культуры B. coli, адептированные к окислению уксусной кислоты, получались на среде, содержащей уксусную кислоту в качестве единственного источника углерода. Манометрические опыты проводились в аппарате Вербурга. В опытах по выявлению промежуточных продуктов окисления уксусной кислоты одно из меченых радиоактивным углеродом C^{14} веществ — уксусная, фумаровая, яблочная, янтарная, пировиноградная или щавелевоуксусная кислота — инкубировалось с одним из предполагаемых промежуточных продуктов окисления уксусной кислоты в присутствии взвеси клеток B. coli. После этого определялась активность этих веществ, выделенных при помощи разделительной хроматографии. Опыты показали, что взвесь клеток B. coli катализирует взаимопревращения янтарной, фумаровой, яблочной, щавелевоуксусной, пировиноградной и уксусной кислот в написанной последовательности, что, по мнению авторов, доказывает участие цикла дикарбоновых кислот в окислении ацетата. Наличие другого возможного механизма окисления — через гликолевую и глиоксиловую кислоты — не было подтверждено опытами, проведенными по описанной выше методике.

Далее было установлено, что окисление кислот дикарбонового цикла и уксусной кислоты клетками B. coli сильно тормозится при отсутствии в среде неорганического фосфата, причем было показано, что фосфат участвует в конденсации: $2CH_3COOH \rightarrow$ $\rightarrow$ янтарная кислота. Так, при инкубации меченого ацетата + немеченая янтарная кислота + взвесь B. coli + PO_4''' янтарная кислота приобрела активность 1322 имп/мин. Окисление уксусной кислоты тормозится ядами, тормозящими фосфорилирование: арсенитом, азидом и 2—4-динитрофенолом, а также цианидом. Последнее указывает на участие цитохронной системы в окислении уксусной кислоты.

Ю. Сорокин

Wahl R. **Les réactivités des souches bactériennes vis-à-vis des phages. Méthodes d'évaluation.** (Реактивность бактериальных штаммов по отношению к фагу. Методы количественного учета). Ann. Inst. Pasteur, t. 83, № 5, pp. 653—665, 1952.

Автор считает, что понятие о вирулентности фагов, введенное Д'Эреллем, практически является весьма относительным и мало способствует сравнительному изучению реакций, происходящих между бактериальной популяцией и различными действующими на нее фагами. По мнению автора, более целесообразным и отвечающим наблюдаемым фактам окажется предлагаемое им понятие реактивности бактериальных штаммов. Реактивность является определенным свойством данного бактериального штамма и характеризует его отношение к данному фагу. Общая реактивность штамма складывается из фактически существующей реактивности (réactivité actuelle), измеряемой количеством восприимчивых к фагу бактерий данной популяции, которое и определяет первичный лизис, и потенциальной реактивности, зависящей от количества вновь возникающих в течение периода взаимодействия с фагом восприимчивых бактерий и от характера вторичных фагорезистентных клеток.

В работе описываются различные методы количественного учета фактически существующей и потенциальной реактивности. Они основаны на подсчете определенного количества фагочувствительных или фагорезистентных бактерий из обследуемой популяции. Подсчет фагочувствительных бактерий проводится прямым или косвенным (по количеству инфицировавших фаговых частиц) путем. Вычисление фагорезистентных бактерий может быть проведено тремя методами: после лизиса на плотной среде, после лизиса на жидкой среде, путем лизиса в сериальных разведениях; последний метод, который заключается в определении наибольшей, еще полностью лизирующейся популяции, наиболее точен. Вычисление потенциальной реактивности проводится прямым (изучение размножения культуры) или косвенным методом (изучение размножения фага). Выбор того или иного метода учета зависит от содержания фагочувствительных бактерий в исследуемой популяции. При очень высоком содержании лучшим является метод подсчета фагорезистентных бактерий путем сериальных разведений; при малом количестве для учета фактически существующей реактивности следует пользоваться методом прямого подсчета фагочувствительных бактерий, а для учета потенциальной реактивности — методом изучения размножения фага.

А. Кривиский

Jacob F. **Développement spontané et induit des bactériophages chez des Pseudomonas pyoceanea polylysogènes.** (Спонтанное и индуцированное развитие бактериофага у полилизогенного штамма Pseudomonas pyocyaneae). Ann. Inst. Pasteur, t. 83, № 5, pp. 671—692, 1952.

После одновременного заражения несколькими фагами фагочувствительного штамма 13 Pseudomonas pyocyaneum из фагорезистентных колоний вторичного роста были выделены полилизогенные штаммы, в которых каждая клетка обладала потен-

циальной способностью к продукции двух разных фагов. Таким образом, были получены два штамма — 13 (8—1), продуцировавший фаги 8 и 1, и 13 (8—4), продуцировавший фаги 8 и 4. Профаги 4 и 8 после облучения лизогенных клеток ультрафиолетом превращаются в активные фаги и вызывают лизис клеток (индуцируемые профаги); профаг 1 под влиянием облучения не переходит в активный фаг (неиндуцируемый профаг).

В работе изучались следующие два вопроса: 1) может ли наличие в клетке индуцируемого ультрафиолетом профага сообщить находящемуся в той же клетке неиндуцируемому профагу способность к развитию в активную форму; 2) может ли облучение вызвать одновременное развитие в клетке двух разных профагов. Для решения первого вопроса применялся штамм 13 (8—1), содержавший индуцируемый и неиндуцируемый профаги, для решения второго — штамм 13 (8—4), содержавший только индуцируемые профаги. Количественный учет продукции разных фагов осуществлялся путем засева проб исследуемых лизогенных штаммов на чашки с культурами-индикаторами, чувствительными только к какому-нибудь одному из трех изучавшихся фагов. Чтобы предотвратить дальнейшую продукцию фагов лизогенными штаммами после их засева на чашки, в засеваемые пробы добавлялся стрептомицин, а в качестве культур-индикаторов применялись стрептомициноустойчивые штаммы.

Удалось установить, что бактериальные клетки штамма 13 (8—1), содержащие два профага, могут спонтанно продуцировать только один из них (фаг 8). После индукции ультрафиолетом более 95% клеток лизируется и выделяет фаг 8, но количество фага 1 по сравнению с необлученным контролем не увеличивается. Таким образом, наличие в клетке способного к индукции ультрафиолетом профага не сообщает этого свойства находящемуся в той же клетке неиндуцируемому профагу.

Путем засева на чашки с культурами-индикаторами проб из лизогенного штамма 13 (8—4), разведенных до такой степени, чтобы на каждую чашку попало в среднем не более одной спонтанно продуцирующей фаг клетки, было показано, что 50% таких клеток продуцируют фаг 4, 25—30% клеток — фаг 8, а 20—30% клеток продуцируют одновременно оба фага 4 и 8. После облучения слабыми дозами, вызывающими образование фага у 20—30% клеток, индуцируемые бактерии продуцируют только какой-нибудь один из фагов (4 или 8). После облучения сильными дозами, вызывающими фагообразование более чем у 95% клеток, 90% клеток одновременно продуцируют оба фага. По мнению автора, вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что после индукции разные фаги, находящиеся в одной и той же клетке, развиваются независимо друг от друга и сохраняют свою индивидуальность. В заключение обсуждаются возможные механизмы индукции ультрафиолетом и причины спонтанной продукции фага лизогенными культурами.

А. Кривицкий

Siminovitch L. and Rapkine S. **Biochemical modifications in lysogenic B. megatherium 899 (I) after induction with ultraviolet light.** (Биохимические изменения в клетках лизогенного штамма B. megatherium 899 (I) после индукции ультрафиолетом). Biochimica et Biophysica Acta, v. 9, № 5, pp. 478—487, 1952.

После заражения фагочувствительных бактериальных культур фагом, происходящим из лизогенных штаммов Escherichia coli (K-12), B. megatherium, Pseudomonas pyocyanea, Staphylococcus aureus, прежде чем подвергнуться лизису, клетки этих культур проходят еще несколько «остаточных» делений. Точно так же ведут себя клетки вышеупомянутых лизогенных штаммов после их облучения ультрафиолетом. Фаги этого типа авторы предлагают назвать умеренно-вирулентными («temperate»), в отличие от вирулентных фагов Т-серии кишечной палочки штамма B, которые, как известно, сразу после заражения приостанавливают размножение клеток.

Биохимические изменения в клетках кишечной палочки, происходящие после заражения вирулентными фагами, уже хорошо изучены. В настоящей работе изучались биохимические изменения в клетках, содержащих умеренно-вирулентный фаг. Опыты проводились на клетках лизогенного штамма B. megatherium 899 после их облучения ультрафиолетом. Как известно из предыдущих работ, облучение индуцирует переход неактивного фага, содержащегося в лизогенных клетках, в активный, который после нескольких клеточных делений вызывает обычный лизис. Облучение проводилось в темноте на расстоянии 50 см. Доза — 250 эрг/мм². В этих условиях индуцировалось до 90% клеток. Нуклеиновые кислоты определялись по методу Шнейдера (Schneider), рибонуклеиновая кислота — по Межбауму (Mejbaum), а дезоксирибонуклеиновая — по Штумпфу (Stumpf).

Предварительные опыты показали, что при 37° облученные лизогенные клетки делятся через каждые 20—25 минут, а при 27° — через 37—40 минут. Первые частицы свободного фага при 37° появляются в среде через 43 минуты, а первые частицы внутриклеточного фага (предварительный искусственный лизис производился при помощи лизоцима) через 30 минут после облучения. При 27° период внутриклеточного размножения фага удлиняется до 102 минут, а первые фаговые частицы внутри клетки появляются через 72 минуты. При увеличении дозы облучения период внутри-

клеточного размножения фага удлиняется, а количество остаточных клеточных делений уменьшается.

Изучение биохимических изменений в клетках показало, что, в отличие от фагов Т-серии, в данном случае формирование внутриклеточного фага не блокирует синтеза дыхательных ферментов и рибонуклеиновой кислоты в клетке: уровень дыхания и накопление рибонуклеиновой кислоты повышаются соответственно и строго параллельно размножению клеток. Таким образом, умеренно-вирулентные фаги не нарушают некоторых нормальных синтетических процессов клеточного метаболизма, чем они и отличаются от вирулентных. Однако оказалось, что так же как и при развитии вирулентных фагов, синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты после индукции ультрафиолетом немедленно приостанавливается (на 30 минут). Затем следует период ускоренного накопления дезоксирибонуклеиновой кислоты. Если той же дозой облучаются клетки фагочувствительного нелизогенного штамма М («мутилат»), то не наблюдается прекращения синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты. Это показывает, что блокада синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты связана не с облучением, а так же как и при заражении Т-фагами, с внутриклеточным развитием фага. При повышении температуры длительность периода задержки синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты уменьшается, а при усилении дозы облучения — увеличивается.

По мнению авторов, эти данные показывают, что основным и всеобщим проявлением процесса внутриклеточного развития активного фага является первичная блокада клеточного синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты.

А. Кривиский

Siminovitch L. et Jacob F. **Biosynthèse induite d'un enzyme pendant le développement des bactériophages chez Escherichia coli K-12.** (Биосинтез адаптивного фермента при развитии бактериофага в клетках Escherichia coli K-12). Ann. Inst. Pasteur, t. 83, No. 6, pp. 745—754, 1952.

У кишечной палочки штамм К-12 биосинтез фермента β-галактозидазы индуцируется некоторыми β-галактозидами, в частности лактозой. Известно, что после заражения кишечных палочек фагами Т-серии происходит моментальная и полная блокада синтеза β-галактозидазы. Вопрос же о возможности биосинтеза адаптивных ферментов клетками лизогенных штаммов в процессе развития профага в активный фаг пока еще не исследован. В настоящей работе изучалась такая возможность. Для того чтобы вызвать развитие профага в активный фаг, лизогенная культура кишечной палочки К-12 облучалась ультрафиолетом и помещалась в среду с лактозой в качестве единственного источника углерода. Через 50 минут бактерии снова начинали размножаться, а через 130 минут лизировались и освобождали фаг. Таким образом, в отличие от клеток, зараженных фагами Т-системы, лизогенная клетка с развивающимся в ней фагом способна синтезировать новый фермент. Синтез β-галактозидазы в облученной клетке идет с постоянной скоростью почти до момента лизиса. Эта скорость на 50% ниже скорости синтеза в контрольной необлученной культуре. Облучение нелизогенного варианта [К-12(S)] снижает скорость синтеза по сравнению с необлученным контролем только на 20%. Если лактоза добавляется позже облучения (в течение внутриклеточного периода развития фага), то и в этих условиях опыта происходит синтез адаптивного фермента, но чем позже добавляется индуктор (лактоза), тем слабее идет синтез β-галактозидазы.

А. Кривиский

Abelson Ph. H., Bolton E. T. and Aldans E. **Utilization of carbon dioxide in the synthesis of nuclelc acid by Escherichia coli.** (Использование двуокиси углерода в синтезе нуклеиновых кислот бактериями Escherichia coli). J. Biol. Chem., v. 198, No. 1, pp. 179—187, 1952.

В настоящей работе изучалась возможность включения $C^{14}O_2$ в синтез пуриновых и пиримидиновых оснований, изолированных из Escherichia coli, растущих на среде, содержащей $NaHC^{14}O_3$. Опыты ставились на культуре E. coli штамма В, которые суспендировались в солевом растворе, куда добавлялась глюкоза и $NaHC^{14}O_3$. Вся эта смесь инкубировалась в течение 1 часа при 37°, затем клеточная суспензия E. coli центрифугировалась, промывалась и химически фракционировалась. После удаления липидной фракции нуклеиновые кислоты экстрагировались горячей трихлоруксусной кислотой по методу Schneider. Трихлоруксусные экстракты подвергались гидролизу 1 *N* HCl при 100° в течение 1 часа. Гидролизаты разделялись на отдельные основания и нуклеотиды хроматографией на бумаге. Количественные определения проводились спектрофотометрическим методом.

Результаты опытов показали, что на основной культуральной среде так же, как и на среде с добавленными аминокислотами, все пурины и пиримидины, изолированные из нуклеиновых кислот (гуанин, аденин, уридиловая и цитидиловая кислоты), имеют в своем составе меченый углерод, примерно в одинаковых количествах. Добавление к основной среде пуринов или пиримидинов уменьшает содержание изотопа в соответствующих соединениях полинуклеотидов. Эффект добавления пуринов не

зависит от добавления пиримидинов. Это говорит о том, что их пути синтеза не зависят друг от друга. E. coli. используют для синтеза своих нуклеиновых кислот как аденин, так и гуанин, они могут также использовать свободные пиримидины.

И. Вайсфельд

De Ley I. **Le métabolisme de l'acide formique et de hydrogène moléculaire chez E. coli pauvre en azote. Метаболизм муравьиной кислоты и молекулярного водорода при недостатке азота у кишечной палочки).** Bull. Soc. Chim. Biol., t. 33, No. 5—6, pp. 505—507, 1951.

До сих пор окончательно не установлено, осуществляется ли разложение муравьиной кислоты при помощи двух ферментов — дегидрогеназы муравьиной кислоты и гидрогеназы или же в образовании водорода участвует также третий фермент — гидрогенлиаза.

Для решения этого вопроса изучалось аэробное разложение солей муравьиной кислоты кишечной палочкой в условиях различного содержания источника азота — сульфата аммония в синтетической среде (от 6 до 1600 мг на литр). Образование водорода и дыхание измерялись в аппарате Варбурга, активность дегидрогеназы и гидрогеназы определялась по методу Тунберга (Thunberg).

По мере уменьшения содержания азота в клетках до 10,5% сухого веса активность дегидрогеназы муравьиной кислоты и интенсивность дыхания повышались, при дальнейшем снижении содержания азота,— наоборот, падали. Активность гидрогеназы и скорость образования водорода из солей муравьиной кислоты не менялись при содержании азота в клетках от 13 до 12,3%, но при уменьшении содержания азота до 10,7% активность гидрогеназы падала до нуля и водород не выделялся. На этом основании автор считает возможным сделать вывод о том, что в условиях недостатка азота за исчезновение водорода ответственна гидрогеназа; наличие третьего фермента — гидрогенлиазы является излишним. Высокая активность дегидрогеназы муравьиной кислоты и дыхания в условиях недостатка азота показывает, что цитохром является столь важным катализатором, что он формируется даже в очень бедной азотом клетке — в условиях, когда большинство других ферментов уже отсутствует. В заключении статьи даются схемы аэробного и анаэробного разложения муравьиной кислоты.

А. Кривиский

Janke A. **Die Wattenhaube. Ein Verschluss für Kulturgefässe zur Züchtung streng aerober Mikroorganismen).** (Ватная салфетка. Способ закрывания сосуда, применяемого для выращивания строго аэробных микроорганизмов). Archiv. Mikrob., Bd. 17, H. 2, S. 155—159, 1952.

Ватные пробки недостаточно обеспечивают воздухом строго аэробные культуры микроорганизмов и неудобны при проведении опытов на качалках. Автор предлагает применить ватные салфетки. Между двумя стеклами, слабо прижатыми друг к другу, измеряется двухсантиметровый слой ваты, обеспечивающий стерильность. Эта вата помещается между двумя марлевыми кругами и прошивается. Диаметр внутреннего непрошитого круга должен быть немного больше диаметра горла колбы. Ватная салфетка накладывается на отверстие колбы и укрепляется толстым резиновым кольцом у ее горла. Края ее затягиваются тесьмой. Среда в колбе, закрытой таким образом, стерилизуется в автоклаве, посев производится петлей или пипеткой, при этом ватная салфетка проводится через пламя горелки. Автор показывает, что сила испарения воды через ватную салфетку, а значит и степень доступа воздуха в колбу составляет около 30% по сравнению с силой испарения в открытой колбе, в то время как при ватной пробке сила испарения равна 10%.

В. Бирюзова

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

И. Г. Шиллер. **Направленный антагонизм микробов.** Государственное медицинское издательство УССР, Киев, 1952, стр. 134, тираж 10 000. Цена 3 р. 85 к.

Приоритет большого ряда открытий в микробиологической науке по праву принадлежит многим нашим соотечественникам. Великий русский ученый И. И. Мечников впервые высказал мысль об использовании антагонизма между микроорганизмами с целью подавления гнилостной микрофлоры, обитающей в кишечнике человека.

Эта идея была подхвачена учеником и ассистентом Мечникова И. Г. Шиллером, который на ее основе разработал и тщательно изучил проблему так называемого насильственного или «спровоцированного» антагонизма микробов. Однако этой весьма интересной проблеме до последнего времени уделялось очень мало внимания.

Перу И. Г. Шиллера принадлежит около тридцати опубликованных научных работ, посвященных разносторонней разработке вопроса о насильственном антагонизме микроорганизмов. Обобщением всего этого большого материала явилась вышедшая в свет книга названного автора «Направленный антагонизм микробов», в которой подведен итог работам, начатым еще в 1914 г. в лаборатории И. И. Мечникова.

И. Г. Шиллеру принадлежит приоритет в разработке метода направленного антагонизма микробов — метода, при помощи которого можно направленно получать определенные антибиотические вещества микроорганизмов.

Г. П. Калина[1] дает высокую оценку работам И. Г. Шиллера по проблеме насильственного антагонизма, отмечая, что в этих работах указан четкий путь для искусственного получения определенных веществ, образуемых микроорганизмами, с необходимой для практического применения направленностью. «Перспективы применения явлений насильственного антагонизма,— пишет Калина,— чрезвычайно широки, включительно до возможности воздействия на злокачественные новообразования».

Книга Шиллера «Направленный антагонизм микробов» состоит из двух частей: 1) общей части, включающей в себя четыре главы, и 2) специальной части, состоящей из шести глав и составляющей основной раздел книги. В конце дано краткое заключение и приведен список использованной литературы.

В разбираемой книге основное внимание автора сосредоточено на разборе теоретических вопросов, связанных с явлением насильственного антагонизма. Однако Шиллер довольно подробно останавливается на практическом использовании продуктов насильственного антагонизма, отмечая, что терапия этими продуктами «вполне себя оправдала в дерматологии (с 1930 года) и в стоматологии (с 1937 года)» (стр. 4).

В настоящей рецензии основное внимание сосредоточено на разборе теоретической части вопроса, представляющей, как нам кажется, наиболее важный и интересный раздел работы.

Сущность насильственного антагонизма состоит в том, что если бактериям, которые в естественных условиях не проявляют никаких признаков антагонизма, создать такие условия, при которых в среде имелся бы недостаток питательных веществ (азотных или углеродных), то одна из бактерий, обладающая способностью выделять протеолитические ферменты, может использовать в качестве питательного материала другие бактерии.

«Отправной точкой первых опытов,— пишет автор книги,— являлось предположение, что в условиях азотного голодания одни бактерии способны покрывать свою потребность в азоте за счет белка других микробов, находящихся с ними в одной среде..., выделяя при этом специфические бактериолизины» (стр. 8).

Выращивая в голодной среде (дестиллированная вода или водный агар) Bac. mesentericus одновременно с клетками стрептококка, автор получал развитие картофельной палочки за счет клеток стрептококка, которые растворялись особыми лизинами, выделяемыми Bac. mesentericus.

Шиллеру удалось получить эти лизины в концентрированном виде путем упаривания в термостате при 37° культуральной жидкости, в которой шло развитие Bac. mesentericus. Культуральная жидкость предварительно освобождалась от клеток картофельной палочки.

---

[1] Г. П. Калина. Изменчивость патогенных микробов. Мед. изд-во УССР, 1949.

При введении разбавленного водой, предварительно сконцентрированного лизина к свежим клеткам стрептококка, которые находились в полноценной питательной среде, последние подвергались лизису.

Известно, что живая бактериальная клетка не может быть использована в качестве питательного материала другим микроорганизмом до тех пор, пока она не будет убита.

В условиях насильственного антагонизма живая бактерия может быть использована активным антагонистом лишь после того, как она будет убита особым антибактериальным веществом, выделяемым в окружающую среду. На эту способность обращает внимание Шиллер, отмечая, что «повидимому, микроорганизмы сначала убивают бактерии, а затем используют их (ферментируя) для питания. На живые клетки чужеродные ферменты обычно не действуют. Следовательно, в первую очередь вырабатываются антибактериальные вещества, убивающие бактерии, а затем используется для питания содержимое клетки» (стр. 9).

Это антибактериальное вещество, выделяемое в среду, представляет, с нашей точки зрения, большой интерес как основной фактор всего процесса насильственного антагонизма. Мы подчеркиваем эту мысль, что антибактериальное вещество играет основную роль в процессе антагонизма, так как главное при этом процессе безусловно связано с защитной функцией организма, а не с процессом питания, который выступает как второстепенный, подчиненный фактор. Это мнение находит подтверждение в том, что насильственный антагонизм проявляется не только на голодных средах, но и на полноценных питательных субстратах.

Шиллер в этой связи приходит к совершенно правильному выводу, что «насильственный антагонизм у микроорганизмов отождествляется с их защитной функцией и находит свое выражение в выделении в среду бактерицидных и бактериолитических веществ.

Иногда пищеварительные и защитные функции обеспечиваются одним и тем же механизмом (голодная среда), иногда (в средах, содержащих пищевые начала, или же в организме животного — кишечнике) эти функции расчленены. И в том и в другом случае бактерии реагируют секреторно на присутствие в среде других клеток — убивают их выделяемыми продуктами и растворяют их» (стр. 18).

Таким образом, мы видим, что при явлении насильственного антагонизма в условиях голодной среды можно установить две функции деятельности микроба-антагониста: 1) выделение в окружающую среду антибактериальных веществ, убивающих живую бактериальную клетку, и 2) использование содержимого убитой клетки в качестве питательного материала, за счет чего и идет размножение антагониста. О том, в каком соотношении друг к другу находятся эти две функции, речь будет идти ниже.

Весьма ценным обобщением в теории насильственного антагонизма является то, что это явление биологически обратимое. «Это значит,— пишет автор книги,— что микроорганизм, служащий в одном случае источником питания для другого, при перемене жизненных условий может в свою очередь извлекать из последнего необходимые для своего питания вещества» (стр. 58).

Насильственный антагонизм, отмечает Шиллер, может проявляться не только между различными видами бактерий, но также между бактериями и дрожжами, между микроорганизмами и отдельными тканями животных (животными клетками). Этот последний факт, связанный с вынужденным питанием микробов различными животными клетками, представляет особый интерес.

Выращивая протеолитических сапрофитов на некоторых органах животных (например, сердечная мышца мыши) в голодной среде, автор книги показал, что бактерии в этих условиях используют животную ткань, выделяя при этом литические вещества. При введении этих литических веществ в организм животного они действуют на него токсически.

Этими экспериментами по использованию микроорганизмами животных тканей создаются предпосылки, как отмечает Шиллер, «для терапевтических опытов со злокачественными опухолями» (стр. 113). Большой интерес представляет третья глава книги, посвященная насильственному антагонизму и вопросам туберкулеза.

Принципом насильственного антагонизма является, как уже отмечалось выше, то, что при определенных условиях культивирования один микроорганизм может быть превращен в антагониста другого вида и наоборот. Основываясь на этом принципе, Шиллер использовал в качестве активного антагониста по отношению к туберкулезной палочке дрожжи, которые, будучи высеянными в водный раствор глюкозы с культурой туберкулезной палочки, использовали живые клетки Mycobacterium tuberculosis для своего питания, выделяя при этом соответствующие лизины.

«Переваривание дрожжами туберкулезной палочки,— пишет Шиллер,— представляет большой теоретический, а также практический интерес. С теоретической точки зрения заслуживает внимания приучение дрожжей к выделению атипичных ферментов, необходимых для переваривания туберкулезной палочки, отсутствующих в чистых культурах. С практической точки зрения переваривание туберкулезных палочек такими безобидными микроорганизмами, как дрожжами, может иметь терапевтическое значение» (стр. 67).

В качестве активных антагонистов по отношению к туберкулезной палочке были испытаны также протеолитические организмы (Bac. subtilis, Bac. mesentericus, Bac.

megatherium и др.), которые на полноценных питательных средах не образуют веществ, оказывающих влияние на туберкулезную палочку. Но если этим организмам создать специальные условия культивирования (поместить их в голодную среду вместе с клетками Mycobacterium tuberculosis), то они выделяют вещества, растворяющие клетки туберкулезной палочки.

Используя принцип биологической обратимости в явлении насильственного антагонизма, автор книги выращивал туберкулезную палочку в условиях голодной среды на дрожжевых клетках. При этом туберкулезная палочка выделяла вещества, которые, по мнению Шиллера, приближаются к токсигенным продуктам, образуемым в организме. Вещества, выделяемые туберкулезной палочкой, получили название туберкулина, природа которого, к сожалению, еще не изучена. Во всех приведенных примерах, хорошо иллюстрирующих явление насильственного антагонизма, не вызывает сомнения факт образования специфических веществ, убивающих и растворяющих живые клетки организмов другого вида.

Из изложенного вытекает основной вывод, что микроорганизмы при определенных условиях культивирования могут довольно существенно менять соответственно новым условиям характер своего обмена веществ, в результате которого возможно образование специфических веществ, не свойственных прежней природе организма.

Несмотря на большой фактический материал, хорошо изложенный и обобщенный в разбираемой книге, работа, к сожалению, не лишена некоторых недостатков. Основными недостатками, с нашей точки зрения, являются следующие.

1. И. Г. Шиллер, на наш взгляд, неправильно разрешает вопрос о том, за счет чего в условиях полного отсутствия питательных веществ в среде (например, в дестиллированной воде) начинает развиваться организм на первых этапах своей деятельности и образовывать при этом специфические литические вещества.

Правильное разрешение этого важного вопроса теории насильственного антагонизма помогло бы гораздо глубже вникнуть в процесс разбираемого явления.

Трудно себе представить предположение автора, что микроорганизм, придя в соприкосновение с клетками другого вида, начинает сразу выделять специфические литические вещества.

Известно, однако, что для того, чтобы микроорганизм начал выделять какое-либо вещество, он должен быть в активном жизнедеятельном состоянии, т. е. должен питаться и осуществлять обмен веществ. Тем более для образования специфических, не свойственных его природе веществ, убивающих и растворяющих живые бактериальные тела, микроорганизм должен в процессе своего развития (быть может, и не в одном поколении) изменить характер своего обмена. Все это мыслимо только в процессе жизнедеятельности, связанной с использованием определенных веществ, принимающих участие в конструктивном и энергетическом обмене микроорганизма. О наличии подобных веществ в дестиллированной воде, разумеется, не может быть и речи.

Хотя известно, что в дестиллированной воде бактериальная клетка, повидимому, за счет собственных запасных веществ может осуществить одно- или двукратное деление, однако вряд ли возможно в данном случае появление столь необычного для организма в естественных условиях свойства, как образование специфических продуктов обмена, убивающих и растворяющих живые клетки другого вида.

Автор книги представляет себе развитие антагониста в голодной среде вследствие лишь одного фактора присутствия в среде организмов другого вида. Эту мысль Шиллер формулирует следующим образом: «в ответ на присутствие в среде организмов другого вида (внешнее воздействие) происходит усиленное деление микробов» (стр. 24). Такой подход к процессу развития организмов нам представляется односторонним и по существу ошибочным. В данном случае речь должна идти об изменении наследственных свойств организма, которое может произойти в процессе его развития и лишь при том условии, если будет в этом процессе изменен характер обмена. Поэтому не может быть образования специфических веществ микроорганизмом лишь в результате одного фактора присутствия организмов другого вида без наличия определенного процесса обмена веществ, происходящего в бактериальной клетке ряда поколений.

Повидимому, при культивировании организмов в условиях голодной среды существенную роль на первых стадиях роста оказывают влияние продукты автолиза клеток. Схематически этот процесс можно представить себе следующим образом.

В процессе использования продуктов автолиза клеток происходит преимущественное развитие того организма, который находится в данных условиях в более выгодном положении. В ходе развития культуры вновь образующиеся клетки попадают в иные условия среды, в связи с чем они могут менять свой обмен веществ соответственно новым условиям культивирования. Одновременно с развитием одного организма в среде в деятельном состоянии могут находиться клетки другого вида. Безусловно, в этих условиях фактор борьбы за существование между разными видами играет существенную роль.

В процессе борьбы за существование, связанной с процессом развития организмов, некоторые клетки одного вида, изменив свой обмен веществ соответственно новым условиям культивирования, могут оказаться способными образовывать антибактериальные вещества, лизирующие клетки другого вида. Продукты лизиса клеток используются затем в качестве питательного материала активным антагонистом.

2. Во второй главе второго раздела, посвященной разбору насильственного антагонизма между дрожжами и бактериями, Шиллер обращает внимание на взаимоотношения оспенного вируса с дрожжами на основании исследований Зильбера и Востроуховой (1932), считая при этом, что здесь существует типичный насильственный антагонизм. При этом, по мнению Шиллера, вирус выступает в качестве антагониста.

В одной из последних работ Зильбера[2] отмечается, что между вирусами оспенной вакцины и дрожжами Torula kephir существует явление симбиоза. Однако при этих симбиотических взаимоотношениях, указывает названный автор, несомненно наличие и антагонистических отношений. Но этот антагонизм проявляется в том, что бактериальные полисахариды тормозят развитие некоторых вирусов. Зильбер, ссылаясь на микрофотографии Бошьяна (1949), считает также, что и вирус инфекционной анемии лошадей связан с дрожжевыми клетками, которые являются носителями первого.

Все эти данные говорят о том, что некоторые вирусы могут находиться в определенных взаимоотношениях с дрожжами и что эти взаимоотношения существуют у них в естественных условиях.

Если придерживаться взгляда Шиллера о том, что насильственный антагонизм имеет место только в условиях, создаваемых экспериментатором, то нет необходимости рассматривать такие взаимоотношения, имеющие место в естественных условиях и существующие без вмешательства экспериментатора, как явления насильственного антагонизма.

Однако прав ли И. Г. Шиллер, считая что «насильственный антагонизм у микробов обнаруживается только в условиях, создаваемых экспериментатором. Естественный же антагонизм проявляется в условиях обычного роста и размножения микробов в чистой культуре» (стр. 38)? Нам представляется, что рассматривать различия между «насильственным» и «естественным» антагонизмом на том основании, на котором базируется автор книги, не вполне убедительно. В самом деле, в природных условиях, независимо от воли экспериментатора, вполне возможны случаи такого взаимоотношения микроорганизмов, где бы один из них находился в более выгодном положении по сравнению с другим и мог бы использовать содержимое клеток последнего в качестве питательного материала.

3. Четвертая глава второго раздела книги посвящена обоснованию существования насильственного антагонизма между бактериями in vivo.

Доказательством существования насильственного антагонизма в условиях обильного питания in vivo явилось изучение кишечной микрофлоры.

Шиллеру с сотрудниками удалось посредством кормления животных и человека лактозой или декстрином добиться преимущественного развития в их кишечнике молочнокислой бактерии Bact. bifidum (факультативно-анаэробный вариант Bact. acidophilum). Преобладание в кишечнике Bact. bifidum при данных условиях кормления животных и человека автор книги объясняет тем, что этот организм «находится в преимущественном положении по отношению к другим бактериям, ему легче с ними бороться, что он и делает, выделяя бактериолитические для них вещества» (стр. 91). Иными словами, Шиллер усматривает здесь типичное явление насильственного антагонизма между Bact. bifidum, с одной стороны, и сопутствующей микрофлорой, главным образом гнилостной,— с другой.

Однако, с нашей точки зрения, для такого утверждения нет того «непосредственного наблюдения над воздействием одного из них (микроорганизмов.— *Н. Е.*) на жизненные функции другого», о котором справедливо указывает автор книги на стр. 86.

Под понятием насильственного антагонизма, как уже отмечалось, Шиллер подразумевает использование одного микроорганизма другим в качестве питательного материала. Аналогичного процесса с микрофлорой кишечника автором не установлено.

Вывод же о существовании насильственного антагонизма в кишечнике делается лишь на основе предположения, на косвенных доказательствах. Но есть также основания предположить и другое.

Безусловно, в кишечнике между молочнокислыми бактериями и сопутствующей микрофлорой существует антагонизм, на что еще указывал И. И. Мечников. Но этот антагонизм обуславливается, с одной стороны, тем, что благодаря жизнедеятельности молочнокислых бактерий создаются неблагоприятные условия среды для сопутствующей микрофлоры вследствие изменения pH среды за счет образования молочной кислоты. С другой стороны, установлено, что молочнокислые бактерии, обитающие в кишечнике, могут, кроме молочной кислоты, образовывать и специфические антибактериальные вещества, на что также в свое время указывал Мечников. Тем не менее вряд ли можно говорить здесь о насильственном антагонизме.

Теория насильственного антагонизма Шиллера является вполне обоснованной целым рядом убедительных примеров, и для ее доказательства нет надобности привлекать факты, которые, с точки зрения названной теории, вызывают сомнения.

Книга Шиллера «Направленный антагонизм микробов» только выиграла бы, если

---

[2] Л. А. Зильбер. О симбиозе вирусов и микробов. Успехи совр. биол., 33, вып. 1, 1952.

бы автор ее не привлекал с такой настойчивостью для подкрепления теории насильственного антагонизма примеры о взаимоотношениях Bact. bifidum и сопутствующей микрофлоры кишечника и вирусов с дрожжами, которые не могут убедить читателей в том плане, в котором хочет их использовать автор книги.

Несмотря на отмеченные недостатки, в целом книга Шиллера представляет несомненный интерес не только для работников теоретической и практической медицины, но и для общих микробиологов и других специалистов биологической науки.

Перед микробиологами стоит задача поисков новых антибиотических веществ, обладающих активным действием против определенных групп микроорганизмов.

Выпущенная Государственным медицинским издательством Украины книга И. Г. Шиллера «Направленный антагонизм микробов» может оказать помощь микробиологам в деле направленного получения микроорганизмов с определенными свойствами.

Н. С. Егоров

БИБЛИОГРАФИЯ ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

(1951—1952 гг.)

(*Продолжение, см. т. XXII, № 3*)

б) Биохимия и физиология

Abnaudi C. Oxidations microbiennes des steröides. Exper., 1951, vol. 7, No. 3, p. 81—89.

Abrams A. and Jacobsen C. F. Activation of chymotrypsinogen by a proteinase from B. subtilis. C. R. Lab. Carlsberg, Ser. chim., 1951, vol. 27, No. 20, p. 447—454.

Ajl S. J. Terminal respiratory patterns in microorganisms. Bact. Rev., 1951, vol. 15, No. 4, p. 211—244.

Akamatsu Sh. and Kanai Y. Bacterial decomposition of creatinine. I. Creatinomutase. Enzymologia, 1951, vol. 15, fasc. 3, p. 122—125.

Akamatsu Sh. and Miyashita R. Bacterial decomposition of creatinine. II. Kinetics of creatinomutase. Enzymologia, 1951, vol. 15, fasc. 3, p. 158—165.

Altenbern R. A. and Housewright R. D. Carbohydrate oxidation and citric acid synthesis by smooth Brucella abortus, Strain 19. Arch. Biochem. Biophys., 1952, vol. 36, No. 2, p. 345—346.

Ammann A. Über die Bildung von Zellulase bei pathogenen Mtcroorganismen. Phytopath. Z., 1952, Bd. 18, H. 4, S. 416—446.

Anchel M. Acetylenic compounds from fungi. J. Amer. Chem. Soc., 1952, vo.. 74, No. 6, p. 1588—1590.

Andrews E. A. and Williams V. R. Biotin synthesis by Lactobacillus casei. J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, No. 1, p. 11—12.

Aschner M. and Kutzenok A. Differences in chemical activity between the clostridial and rod stages of Clostridium butylicum. Bull. Res. Council Israel, 1951, vol. 1, No. 1/2, p. 151—152.

Aubert J.-P. Etude biochimique du rendement matériel de croissance d'une bactérie aerobie Bacillus megatherium. II. Etude de la croissance sur glucose. Ann. Inst. Pasteur, 1952, t. 82, No. 5, p. 608—622.

Avezzu G. Acido ascorbico epicatechina e pigmentogenesi di Pseudomonas aeruginosa. Boll. Soc. Ital. Biol. sperim., 1951, vol. 27, fasc. 1/2, p. 106—107.

Ayengar P. and Roberts E. Inhibition of utilization of glutamic acid by Lactobacillus arabinosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, vol. 79, No. 3, p. 476—481.

Ayengar P., Roberts E. and Ramasarma G. B. Rôles of glutamine in growth of Lactobacillus arabinosus. J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, No. 2, p. 781—791.

Bacon J. S. D. Transfructosidation by a yeast invertase preparation. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 3, p. XVIII.

Balis M. E. and Elion G. B. Utilization of some purine ribose derivatives by Lactobacillus casei. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, pt. 1, p. 183.

Barbier M. et Lederer E. Sur un acide aminé du phosphatide de Mycobacterium phlei. Biochem. Biophys. Acta, 1952, vol. 8, No. 5, p. 590—591.

Baribo L. E. and Foster E. M. The production of a growth inhibitor by lactic streptococci. J. Dairy Sci., 1951, vol. 34, No. 11, p. 1136—1144.

Baribo L. E. and Foster E. M. Some characteristics of the growth inhibitor produced by a lactic streptococcus. J. Dairy Sci., 1951, vol. 34. No. 11, p. 1128—1135.

Barnett H. L. and Lilly V. G. The inhibitory effects of sorbose on fungi. Science, 1951, vol. 114, No. 965, p. 439—440.

Barton-Wright E. C. Some aspects of the nitrogen metabolism of yeast. J. Inst. Brewing, 1951, vol. 57, No. 6, p. 415—426.

Baskett A. C. The resistance of Bact. lactis aerogenes to proflavine (2:8-diaminoacridine). II. The direct induction of adaptation. Proc. Roy. Soc., B., 1952, vol. 139, No. 895, p. 251—262.

Baskett A. C. and Hinshelwood S. C. The mechanism of the training of Bact. lactis aerogenes to D-arabinose. Proc. Roy. Soc., B., 1952, vol. 139, No. 894, p. 58—73.

Batta G. et Lecoq H. Ftude des levures par electrodialyse. Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 1952, t. 34, No. 1/2, p. 108—114.

Baumann A. und Denk V. Zur Physiologie der Sulfatreduktion. Arch. Mikrobiol., 1951, Bd. 15, No. 2, S. 283—307.
Beard J. W. Physical and chemical characteristics of viruses. Ann. rev. Microbiol., 1951, vol. 5, p. 265—276.
Beerens H. et Hvid-Hansen N. Présence dans les eaux sulfureuses françaises de bactéries réductrices protéolytique d'Actinobacterium israeli: A. israeli var. liquefaciens. C. R. Acad. Sci., Paris, 1952, t. 234, No. 4, p. 480—482.
Benedict R. G., Lindenfelser L. A., Stodola F. H. and Traufler D. H. Studies on Streptomyces griseocarneus and the production of hydroxystreptomycin. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 4, p. 487—497.
Ben-Ishai R., Bergmann E. D. and Volcani B. E. Ribosidation of 4-aminoimidazole-5-carboxamide by Escherichia coli. Nature, Lond., 1951, vol. 168, No. 4287, p. 1124.
Ben-Ishai R., Bolcani B. and Bergmann E. Experiments on the formation of the purine nucleus by E. coli. Bull. Res. Couns. Israel, 1951, vol. 1, No. 1/2, 160—162.
Benzer S. Resistance to ultraviolet light as an index to the reproduction of bacteriophage. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 1, p. 59—72.
Bergmann E. D., Ben-Ishai R. and Volcani B. E. Rôle of 4-aminomidazole-5-carboxamide in purine synthesis by Escherichia coli. J. Biol. Chem., 1952, vol. 194, No. 2, 531—538.
Bergmann E. D., Volcani B. E. and Ben-Ishai R. Effect of methyl donors on 4-aminomidazole-5-carboxamide in Escherichia coli. J. Biol. Chem., 1952, vol. 194, No. 2, p, 521—530.
Beumer J. et Beumer-Jochans M. P. Les exigences en calcium du phage de Lisbonne. Ann. Inst. Pasteur, 1951, t. 81, No. 5, 489—506.
Billen D. The inhibition by nitrate of enzyme formation during growth of Escherichia coli. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 6, p. 793—797.
Billen D. and Lichstein H. C. The effect of X radiation on the adaptive formation of formic hydrogenlyase in Escherichia coli. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 4, p. 533—535.
Birkinshaw J. H., Raistrick H. and Ross D. J. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 86. The molecular constitution of mycophenolic acid, a metabolic product of Penicillium brevicompactum Dierckx. Part 3. Further observations on the structural formula for mycophenolic acid. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 3, p. 630—634.
Birkinshaw J. H., Raistrick H., Ross D. J. and Stickings C. E. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 85. Cyclopolic and cyclopaldic acids, metabolic products of Penicillium cyclopium Westling. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 5, p. 610—628.
Black S. Yeast aldehyde dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys., 1951, vol. 34, No. 1, p. 86—97.
Bolcato V., Scevola M. E. and Tisselli M. Triosephosphates and pyruvic acid intermediates in fermentations of pentoses by living cells of Clostridium acetobutylicum. Experentia. 1952, vol. 8, No. 1, p. 25—26.
Bolton E. T. and Abelson Ph. H. Utilization of carbon dioxide in the synthesis of protein and nucleic acid by Escherichia coli. Science, 1942, vol. 115, No. 2992, p. 479.
Bolton E. T. Cowie D. B. and Sands M. K. Sulfur metabolism in Escherichia coli. III. The metabolic fate of sulfate sulfur. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 3, p. 309—318.
Boyd J. S. K. and Bradley P. L. On the assessment of the influence of chemical compounds on bacteriophage multiplication. Brit. J. exp. Pathol., 1951, vol. 32, No. 5, p. 397—407.
Boyd W. L. and Lichstein H. C. The inhibitory effect of glucose on certain aminoacid deaminases, J. Bact., 1951, vol. 62, No. 6, p. 711—715.
Bregoff H. M. and Kamen M. D. Photohydrogen production in Chromatium. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 1, p. 147—149.
Bregoff H. M. and Kamen M. D. Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. XIV. Quantitative relations between malate dissimilation, photoproduction of hydrogen, and nitrogen metabolism in Rhodospirillum rubrum. Arch. Biochem. Biophys. 1952, vol. 36, No. 1, p. 202—220.
Brian P. W., Curtis P. J., Hemming H. G., Jefferys E. G., Unwin C. H. and Wright J. H. Alternaric acid; a biologically active metabolic product of Alternaria solani (Ell. a. Mart.) Jones a. Grout; its production, isolation and antifungal properties. J. gen. Microbiol., 1951, vol. 5, No. 4, p. 619—632.
Brodie A. F. and Gots J. S. Bacterial DPN-cytochrome c reductase. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part I, p. 191.
Broquist H. P. Involvement of citrovorus factor in synthesis of histidine in yeast. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part 1, p. 191.
Brunel-Capelle G. Sur une forme particulière de décarboxylation biologique. Présence d'un catalyseur de décarboxylation thermostable chez Saccharomyces cerevisiae. C. R. Acad. Sci., Paris, 1951, t. 233, No. 23, p.1480—1481.
Bukatsch F. und Heitzeb J. Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Azotobacter. Arch. Mikrobiol., 1952, Bd. 17, H, 1. S. 79—96.

Bunting M. I., Labrum E. L. and Hemmerly J. The effect of nutrition on the production and stability of an unstable white color-variant of the Hy strain of Serratia marcescens. Amer. Nat., 1951, vol. 85, No. 824, p. 331—332.
Burcik E. Ueber die Beziehungen zwischen Hydratur und Wachstum bei Bakterien und Hefen. Arch. Mikrobiol., 1951, Bd. 15, No. 2, S. 203—235.
Burris R. H. and Wilson P. W. Effect of haemoglobin and other nitrogenous compounds on the respiration of the rhizobia. Biochem. J., 1952, vol. 51, No. 1, p. 90—96.
Cabib E. Paper chromotography of some enzymes and the plasma proteins. Biochem. Biophys. Acta, 1952, vol. 8, No. 6, p. 607—614.
Caldwell P. C. The nature of the phosphorus compounds present in cells of Bact. lactis aerogenes. J. Chem. Soc., 1951, No. 1. p. 166—172.
Caldwell P. C. and Hinshelwood C. The phosphorus metabolism of Bact. lactis aerogenes. J. Chem. Soc., 1951, No. 1, p. 158—166.
Campbell L. L. and Williams O. B. Amino acid utilization by selected species of Achromobacter. Food. Res., 1951, vol. 16, No. 6, p. 504—506.
Cardini C. E. The hexokinases of Escherichia coli. Enzymologia, 1951, vol. 14, Fasc. 6, p. 362—368.
Carson S. F. and Delwiche E. A. Oxidative reactions in the propionic acid fermentation. Federat Proc., 1952. vol. 11, No. 1, part 1, p. 194—195.
Carson S. F., Foster J. W., Jefferson W. E., Phares E. F. and Anthony D. S. Oxidative formation of lactic acid by a fungus. Arch. Biochem., 1951, vol. 33, No. 3, p. 448—458.
Chaix P. et Flamens P. Sur l'aptitude désulfurante de quelques microorganismes homolactiques pourvus ou non de ferments hématiniques Biochem. Biophys. Acta, 1952, vol. 8, No. 1, p. 38—48.
Chance B. Respiratory pigments of metabolising cells. Federat. Proc., 1952, vol. 11 No. 1, part 1, p. 196.
Chang S. Ch., Silverman M. and Keresztesy J. C. Some observations on the action of citrovorum factor in Leuconostoc citrovorum. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 6, p. 753—762.
Chevillard L. et Nguyen van Thoai. Synthèse enzymatique de la cocarboxylase et de la tyrosine codécarboxylase par les phosphokinases de levures. Bull. Soc. Chim. Biol. Paris, 1951, t. 33, No. 9, p. 1147—1151.
Christman J. F. and Williams V. R. The preparation of the coenzyme of aspartic acid deaminase. J. Bact., 1953, vol. 63, No. 1, p. 107—110.
Christophersen J. und Kaufmann W. Chemische Reaktivierung hitzeinaktiv vierter Hefen und Temperaturadaptation. Naturwiss., 1952, Jg. 39, H. 3, S. 67—68.
Cimino S. e Previtera G. Crescita batterica e correlazioni fra aminoaciditi. I. Rapporti tra triptofano e cistina. Boll. Soc. Ital. Biol. sperim., 1951, vol. 27, No. 3, p. 494—496.
Cimino S. e Previtera G. Ricerche sulla sintezi di acido folico da parte del Lactobacillus arabinosus. Boll. Soc. Ital. Biol. sperim., 1951, vol. 27, No. 3, p. 491—493.
Clarke N. A. Studies on the host-virus relationship in a lysogenic strain of Bacillus megaterium, II. The growth of Bacillus megaterium in synthetic medium. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 2, p. 187—192.
Clarke N. A. and Cowles Ph. B. Studies on the host-virus relationship in a lysogenic strain of Bacillus megaterium. I. The relationship between growth and bacteriophage production in cultures of Bacillus megaterium. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 2, p. 177—186.
Clarke P. H. and Cowan S. T. Biochemical methods for bacteriology. J. Gen. Microbiol., 1953, vol. No. 1/2, p. 187—197.
Clegg K. M., Kodicek E. and Mistry S. P. A modified medium for Lactobacillus casei for the assay of B vitamins. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 3, p. 326—331.
Cochrane V. W. The metabolism of species of Streptomyces, V. The role and the pathway of synthesis of organic acids in Streptomyces coelicolor. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 4, p. 459—471.
Cochrane V. W. and Peck H. D. jr. The respiratory metabolism of Streptomyces scabies. Phytopath., 1952, vol. 42, No. 1, p. 5.
Cohen G. N. Metabolism of bacteria. Ann. rev. Microbiol., 1951, vol. 5, p. 71—100.
Cohen I. R. and Rahn O. The resorption of riboflavin by young and old cultures of Lactobacillus casei. Growth, 1951, vol. 15, No. 3, p. 141—145.
Colemann I. W. A study by means of paper chromotography of the growth stimulating properties of liver extract, yeast solubles and trypsin digest of casein for Lactobacillus casei. Can. J. Med. Sci., 1951, vol. 29, No. 4, p. 151—158.
Collins E. B. Action of bacteriophage on mixed strain starter culures. I., Nature and characteristics of the «nascent phenomenon». J. Dairy Sci., 1952, vol. 35, No. 5, p. 371—380.
Collins E. B. Action of bacteriophage on mixed strain starter cultures. II. Relation

to acid production of the proportion of resistant bacteria. J. Dairy Sci., 1952, vol 35, No. 5, p. 381—387.
Colla C. e Sartori L. Ricerche sul metabolismo azotato di un Lattobacillo. Ann. Microbiol., 1951, vol. 4, No. 5/6, p. 124—130.
Cooperman J. M., Drucker R. and Tabenkin B. Microbiological assays for vitamin B_{12}, a cyanide enhancement effect. J. Biol. Chem., 1951., vol. 191, No. 1, p. 135—141.
Courtois J. E. et Manet L. Recherches sur la phytase. XVII. Les phytases du colibacille. Bull. Soc. Chim. Biol. Paris, 1952, t. 34, No. 3/4, p. 265—278.
Cowie D. B., Bolton E. T. and Sands M. K. The labeling of bacterial cells with S^{35} for the production of high specific activity compounds. Arch. Biochem., 1952, vol. 35, No. 1, p. 140—145.
Crook Ph. G. The effect of heat and glucose on endogenous endospore respiration utilizing a modified Scholander microrespirometer. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 2, p. 193—198.
Crowley N. The effect of amino-acids and other substances on the activity of streptococcal hyaluronidase. J. Gen. Microbiol., 1951, vol. 5, No. 5, p. 906—918.
Cutchins E. C., Doetsh R. N. and Pelczar M. J. The influence of medium composition on the production of bacterial lipase. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 2, p. 267—272.
Cutts N. S. and Rainbow C. Non-competitive sulphanilamide antagonists for yeasts. J. Gen. Microbiol., 1951, vol. 5, No. 5, p. 860—868.
Dagley S., Fewster M. E. and Happold F. C. The bacterial oxidation of phenylacetic acid. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 3, p. 327—336.
Davies R., Falkiner E. A., Wilkinson J. F. and Peel J. L. Ester formation by yeasts. I. Ethyl acetate formation by Hansenula species. Biochem. J., vol. 49, No. 1, p. 58—61.
Davis B. D. Aromatic biosynthesis. I. The role of shikimic acid. J. Biol. Chem., 1951, vol. 191, No. 1, p. 315—325.
Davis B. D. Diaminopimelic acid and lysine. Biosynthetic interrelations of lysine, diaminopimelic acid, and threonine in mutants of Escherichia coli. Nature, Lond., 1952, vol. 169, No. 4300, p. 534—536.
Davis R. L., Layton L. L. and Chow B. F. Uptake of radioactive vitamin B_{12} by various microorganisms. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, vol. 79, No. 2, p. 273—276.
Dawes E. A. Observations of the growth of Escherichia coli in media containing amino-acids as the sole nitrogen source. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 5, p. 647—660.
Dean A. C. R. and Hinshelwood S. C. The resistance of Bact. lactis aerogenes to proflavine (2:8-diaminoacridine). I. The applicability of the statistical fluctuation test. Proc. Roy. Soc., B., 1952, vol. 139, No. 895, p. 236—250.
Delga J. Action de trois ypérites à l'azote sur les cellules de levure. Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 1952, t. 34, No. 3/4, p. 402—414.
Delwiche E. A. Activators for the cysteine desulfhydrase system of an Escherichia coli mutant. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 6, p. 717—722.
Denk V. Zur Frage der Ammonentstehung in Stoffkreislauf der Natur. Arch. Mikrobiol., 1951, Bd. 15, No. 2, S. 308—314.
De Vay J. E., Rowell J. B. and Stakman E. Free amino-acids and carbohydrates synthesized by Ustilago zeae. Phytopath. 1952, vol. 42, No. 1, p. 6.
Dewey D. L. and Work E. Diaminopimelic acid and lysine. Diaminopimelic acid decarboxylase, Nature, Lond., 1952, vol. 169, No. 4300, p. 533—534.
Di Carlo F. J., Schultz A. S. and Kent A. M. Cytosine antagonism in yeast by diazobarbituric anhydride. J. Biol. Chem., 1952, vol. 194, No. 2, p. 769—774.
Dietzel E., Behrenbruch H. and Eucken M. Stoffwechselversuche an Actinomyceten, Arch. Mikrobiol., 1951, Bd. 15, No. 2, S. 179—184.
Doermann A. H. The intracellular growth of bacteriophages. I. The liberation of intracellular bacteriophages T_4 by premature lysis with another phage or with cyanide. J. Gen. Physiol., 1952, vol. 35, No. 4, p. 645—656.
Dolin M. I. and Gunsalus I. C. A soluble pyruvate-α-ketobutyrate dehydrogenase system from Streptococcus faecalis. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, p. 203.
Douglas H. C. Glycine fermentation by nongas forming anaerobic micrococci. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 4, p. 517—518.
Doyle M. L. and Katzman Ph. A. Further studies of bacterial β-glucuronidase. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part. I, p. 103.
Drews B., Specht H. und Rothenbach E. Die amylolytishe Aktivität von Aspergillus niger bei submerser Züchtung in verschiedenen Schlempen. Biochem. Z., 1952, Bd. 322, H. 5, S. 380—387.
Dubnoff J. W. Role of B_{12} in methionine synthesis in E. coli mutant 113-3. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part 1, p. 205.
Eddy B. P. Reduction of dehydroascorbic acid by bacteria. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 5, p. 601—605.
Eddy B. P., Ingram M. and Mapson L. W. Reduction of dehydroascorbic acid

by bacteria, 2, Role of cytochrome in hydrogen transport. Biochem. J., 1952, vol. 51, No. 3, p. 375—378.
Eiduson S. and Dunn M. S. Response of lactic acid bacteria to amino acid derivatives. III. Effect of lyophilization on utilization of phenylalanine, phenyllactic acid, and phenylpyruvic acid. Arch. Biochem., 1952, vol. 35, No. 1, p. 146—151.
Elion G. B. and Balis M. E. Purine metabolism of diaminopurine resistant Lactobacillus casei. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part 1, p. 207.
Emard L. O. and Vaughn R. H. Selectivity of sorbic acid media for the catalase negative lactic acid bacteria and clostridia. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 4, p. 487—494.
Engelhard H. und Houtermans T. Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die «Tötung» von Bact. coli durch UV-Licht und Kritik des Eintreffermodells. Naturwiss., 1952, Jg. 39, H. 7, S. 161—162.
Englesberg E. The irreversibility of methionine synthesis from cysteine in Pasteurella pestis. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 5, p. 675—680.
Evans E. A., Putnam F. W. and Palm L. Host nitrogen as source for T_7 bacteriophage. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part 1, p. 209.
Fairhurst A. S., King H. K. and Sewell C. E. Alanine synthesis in bacteria.- Biochem. J., 1952, vol. 51, No. 1, p. XI.
Fales F. W. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. J. Biol. Chemie, 1951, vol. 193, No. 1, p. 113—124.
Farrer K. T. H. The liberation of pantothenic acid from autolysing yeast cells. Austr. J. Exp. Biol., 1951, vol. 29, part 4, p. 285—288.
Finck G. Biologische und stoffwechselphysiologische Studien an Myxococcaceen. Arch. Microbiol., 1951, Bd. 15, No. 2, S. 358—388.
Flaig W. Biochemische Beiträge zur Bildung von Huminsäuren durch Streptomyceten. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde, 1952, Bd. 56, H. 1—3, S. 63—67.
Foster J. W. Metabolism of fungi. Ann. rev. Microbiol., 1951, vol. 5, p. 101—120.
Fowler C. B. The relationship between fermentation and enzymatic adaptation. Biochem. biophys. Acta, 1951, vol. 7, No. 4, p. 563—573.
Fowler E. B. and Werkman C. H. Role of carbon dioxide in the bacterial synthesis of aspartate. Arch. Biochem., Biophys., 1952, vol. 36, No. 2, p. 365—370.
Fox S. W. and Itschner K. F. Bacterial utilization of benzoyl aminoacids and benzoylpeptides. Federat. Proc.. 1952, vol. 11, No. 1, part. 1, p. 214.
Frantz I. D., Feigelman H., Werner A. S. and Smythe M. P. Biosynthesis of seventeen amino acids labelled with C^{14}. J. Biol. Chem., 1952, vol. 195, No. 1, p. 423—428.
Friedman S. Adaption of Achromobacter fisheri to fructose utilization. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part 1, p. 216.
Friedman S. and Cots J. S. Purine and pyrimidine metabolism of normal and phage-infected Escherichia coli B. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part 1, p. 216.
Gaines D. S., Broquist H. P. and Williams W. L. Certain relationship between pteroylglutamic acid, citrovorum factor and cortisone. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, vol. 77, No. 2, p. 247—249.
Gale E. F. and Halteren M. B. The assimilation of amino-acids by bacteria. 13. The effect of certain amino-acids on the assimilation of free glutamic acid by Staphylococcus aureus: extracellular peptide formation. Biochem. J., 1951, vol. 50, No. 1, p. 34—43.
Gale G. R. The inhibition by furacin of adaptive enzyme formation in Mycobacterium butyricum. Science, 1951, vol. 114, No. 2974, p. 689—690.
Gale G. R. The oxidation of benzoic acid by mycobacteria. I. Metabolic pathways in Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium butyricum and Mycobacterium phlei. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 2, p. 273—278.
Garber R. H., Schaal L. A. and Fults T. L. The selective action of pentachlorophenoxyacetic acid against Streptomyces scabies (Thaxt.) Waksman a. Henrici in culture media. Phytopat., 1951, vol. 41, No. 11, p. 991—996.
Gavard M. R. Attaque phosphorylante du glucose par un extrait enzymatique de Clostridium butyricum. C. R. Acad. Sci., Paris, 1952, t. 234, No. 17, p. 1716—1718.
Gavard R. et Milhaud G. Sur un polysaccharide isolé de Clostridium butyricum. Ann. Inst. Pasteur. 1952, t. 82, No. 4, p. 471—483.
Gendre Th. et Lederer E. Sur la présence de l'acide α, ε-diamino-pimélique dans diverses souches de mycobactéries. Biochem. Biophys. Acta, 1952, vol. 8, No. 1, p. 49—55.
Gest H. Metabolic patterns in photosynthetic bacteria. Bact, Rev., 1951, vol. 15, No. 4, p. 183—210.
Gest H. Properties of cell-free hydrogenases of Escherichia coli and Rhodospirillum rubrum. J. Bact., 1952, vol. 63. No. 1, p. 111—121.
Gest H. and Gibbs M. Preparation and properties of a cell-free „formic hydrogenlyase" system from Escherichia coli. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 5, p. 661—664.
Gest H. and Lampen J. O. Fermentation of 1-C^{14}-D-xylose by Lactobacillus pentosus. J. Biol. Chem., 1952, vol. 194, No. 2, p. 555—562.

Gest H. and Stokes J. L. The effect of carbon dioxide on reduction of methylene blue by microorganisms. Antonie von Leeuwenhoek, 1952, vol. 18, No. 1. p. 55—62.
Gibbs M. and Demoss R. D. Ethanol formation in Pseudomonas lindnerri. Arch. Biochem. Biophys., 1951, vol. 34, No. 2, p. 478—479.
Gibson F. and Woods D. D. The synthesis of methionine from homocysteine by Escherichia coli. Biochem. J., 1952, vol. 51, No. 1, p. V.
Gillum A. J. The effect of large amounts of certain vitamins of the B group on the growth rate and morphology of certain bacteria. Butler Univ. Bot. Stud., 1951, vol. 10, No. 1/10, p. 29—39.
Gilvarg Ch. and Bloch K. The utilization of acetic acid synthesis in yeast. J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, No. 1, p. 339—348.
Glover J., Kamen M. D. and Genderen H. Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. XII. Comparative light and dark metabolism of acetate and carbonate by Rhodospirillum rubrum. Arch. Biochem. Biophys., 1952, vol. 35, No. 2, p. 384—408.
Gochnauer T. A. and Wilson J. B. The production of hyaluronidase by Lancefield's Group B streptococci. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 4, p. 405—414.
Goksøyr J. On the effect of chlorate upon the nitrate reduction of plants. II. The effect upon the nitrate-reducing system in Escherichia coli. Physiol. Plant., 1952, vol. 5, fasc. 2, p. 228—240.
Goodkind M. J. and Harvey E. N. Preliminary studies on oxygen consumption of luminous bacteria made with the oxygen electrode. J. Cell. Comp. Physiol., 1952, vol. 39, No. 1, p. 45—56.
Gots J. S., Jordan V. E. and Brodie A. F. Studies on the action of nitrofurans on bacterial enzyme systems. III. Furacin interference with dye reductions by Escherichia coli. Arch. Biochem, Biophys., 1952, vol. 36, No. 2, p. 285—298.
Gregg M. Studies in the physiology of parasitism. XVII. Enzyme secretion by strains of Bacterium carotovorum and other pathogens in relation to parasitic vigour. Ann. Bot., 1952, vol. 16, No. 62, p. 235—250.
Grégoire P. E. L'aspeleine, pigment nouveau isolé du mycélium d'Aspergillus elegans Gasperrini. Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 1951, t. 33, No. 11/12, p. 1681—1691.
Grelet H. Le déterminisme de la sporulation de Bacillus megatherium. II. L'effet de la pénurie des constituants minéraux du milieu synthétique. Ann. Inst. Pasteur, 1951, vol. 82, No. 1, p. 66—77.
Gros F., Beljanski M. et Macheboeuf M. Action de la pénicilline sur le métabolisme de l'acide ribonucléique chez Staphylococcus aureus. Bull. Soc. Chim. Biol., Paris. 1951, vol. 43, No. 11/12, p. 1696—1717.
Grosser A., Kundtner-Schwarzkopf H. und Bernhauer K. Einige Beobachtungen über die Conidienbildung in der Submerskultur verschiedener Penicillium-Arten. Arch. Microbiol., 1951, Bd. 15, No. 2, S. 247—252.
Grosser A., Kundtner-Schwarzkopf H. und Bernhauer K. Über den Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Farbstoffbildung durch Penicillium-Arten. Arch. Mikrobiol., 1951, Bd. 15, No. 2, S. 236—246.
Grove J. F. Gladiolic acid, a metabolic product of Penicillium gladioli. I. Structure. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 5, 648—666.
Grünberg-Manago, Szulmajster J. et Prouvost A. Hydrogénlyase, formico-déshydrogénase et hydrogénase chez Escherichia coli. C. R. Acad. Sci., Paris, 1951, t, 233, No. 25, p. 1690—1692.
Guarino A. J. Gluconate phosphorylation in yeast extracts. Federat. Pros., 1952, vol. 11, No. 1, part. 1, p. 223.
Gyllenberg H. H. G. The influence of phosphates on changes in electrode potentials in liquid media for bacteria. Suomen kemist, 1950, vol. 23 B, No. 3/4, p. 34—38.
Gyllenberg H. H. G. On the determination of the oxidation-reduction capacity („poising effect") in liquid bacteriologal media. Suomen Kemist, 1951, vol. 24 B, No. 5/6, p. 15—21.
Halliwell G. Chromatographic detection of acids in cultures of Aspergillus niger on various substrates. Nature, Lond., 1952, vol. 169, No. 4312, p. 1063—1064.
Hanks J. H. Measurement of the hydrogen transfer capacity of mycobacteria. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 5, p. 521—528.
Harry E. G. The effect of amino-acids on the growth of Lactobacillus casei A. T. C. 7469 in pteroyl glutamic acid-free media. Biochem. J., 1951, vol. 49, No. 1, p. 5—10.
Hassinen J. B., Durbin G. T., Tomarelli R. M. a. Bernhart F. W. The minimal nutritional requirements of Lactobacillus bifidus. J. Bact., 1951, vol. 62, p. 771—777.
Hastings J. W. Oxygen concentration and bioluminescence intensity, I. Bacteria and fungi. J. Cell. Comp. Physiol., 1952, vol. 39, No. 1, p. 1—30.
Hawker L. E. Physiology of myxomycetes. Nature. Lond., 1952, vol. 169, No. 4294, p. 274—275.

Hayaishi O. and Stanier R. Y. The bacterial oxidation of tryptophan, III. Enzymatic activities of cell-free extracts from bacteria employing the aromatic pathway. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 6, p. 691—709.
Hayaishi O. and Stanier R. Y. The kynureninase of Pseudomonas fluorescens. J. Biol. Chem., 1952, vol. 195, No. 2, p. 735—740.
Heald P. J. The fermentation of pentoses and uronic acids by bacteria from the rumen contents of sheep. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 4, p. 503—508.
Hehre E. J. The biological synthesis of dextran from dextrins. J. Biol. Chem., 1951, vol. 192, No. 1, p. 161—174.
Hehre E. J. and Carlson A. S. Evidence on the constitution of melezitose through degradation to sucrose by bacterial action. Arch. Biochem. Biophys., 1952, vol. 36, No. 1, p. 158—171.
Hellinger E. Requirements for pyocyanine production by Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) Migula. J. Gen. Microbiol., 1951, vol. 5, No. 4, p. 633—639.
Hendlin D. and Soars M. H. The effect of 5,6-dimethylbenzimidazole and related compounds on the growth of Lactobacillus lactis Dorner. J. Bact., 1951, vol, 62, No. 5, p. p. 633—638.
Hermanek P. Über die Verwendbarkeit eines Hefeautolysats als Grundlage bakteriologischer Nährboden. Zbl. Bact. Abt. I. Orig., 1951, Bd. 157, No. 6, S. 459—466.
Heyningen W E. The antibacterial activity of haematin. J. Gen. Microbiol., 1951, vol. 5, No. 4, p. 758—765.
Hirsch H. M. and Wallace G. I. The octanoxidase system of Streptomyces aureofaciens. Rev. Canadienne Biol., 1951, vol. 10, No. 3, p. 191—212.
Hochstein P. E. and Cox C. E. Effect of tetrachloro-benzoquinone on certain fermentative enzyme systems in fungi. Phytopath. 1952, vol, 42, No. 1, p. 11.
Hockenhull D. J. D., Walker A. D., Wilkin G. D. and Winder F. G. Oxidation of phenylacetic acid by Penicillium chrysogenum. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 5, p. 605—609.
Hockenhull D. J. D., Wilkin G. D. and Winder F. Production of ketoglutarate by Penicillium chrysogenum. Nature, Lond., 1951, vol. 168, No. 4285, p. 1043.
Hoff-Jorgensen E. The effect of „Intrinsic Factor" on the adsorption of vitamin B_{12} by wild type Escherichia coli. Arch. Biochem, Biophys., 1952, vol. 36, No. 1, p. 235—236.
Hoff-Jorgensen E. A microbiological assay of deoxyribonucleosides and deoxyribonucleic acid. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 3, p. 400—403.
Hoffmann C. E. Desoxyribose transfer by nucleosidases of Escherichia coli. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part. 1, p, 231.
Hoffmann H. The cytochemistry of bacterial nuclear structures. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 5, p. 561—570.
Hoffmann H. A. and Pavcek P. L. Studies on purine and pyrimidine requirements of a strain of Streptococcus faecalis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, vol. 78, No. 3, p. 734—737.
Hofmann K., Lucas R. A. and Sax S. M. The chemical nature of the fatty acids of Lactobacillus arabinosus. J. Biol. Chem., 1952, vol. 195, No. 2, p. 473—485.
Hotchin J. E. The influence of acridines on the interaction of Staphylococcus aureus and staphylococcus K phage. J. Gen. Microbiol., 1951, vol. 5, No. 4, p. 609—618.
Hughes D. E. The inhibition of growth and cozymase synthesis in bacteria by halogen-substituted nicotinic acids. Biochem. J., 1952, vol. 51, No. 3, p. XXII.
Hughes D. E. and Williamson D. H. The synthesis of cozymase from nicotinic acid and its derivatives by Lactobacillus arabinosus 17-5. Biochem. J., 1952, vol. 51, No. 3, p. 330—338.
Hugo W. B. and Street H. E. The effect of phenol, 2-phenoxyethanol and cetyltrimethylammonium bromide on the oxidation of various substrates by Escherichia coli. J. Gen. Microbiol., 1952, vol. 6, No. 1/2, p. 90—94.
Imelik B. Etude sur l'adsorption de l'eau par des bactéries. Ann. Inst. Pasteur, 1951, t. 81, No. 5, p. 562—571.
Isotopes in Microbiology. Nature, Lond., 1952, vol. 169, No. 4289, p. 54—56.
Jacob F. Production de bactériophages par action de la methyl-bis (chloroethyl) amine sur des bactéries lysogènes. C. R. Acad. Sci., Paris, 1952, vol. 234, No. 22, p. 2238—2240.
Jacob F., Torriani A. M. et Monod J. L'effet du rayonnement ultraviolet sur la biosynthèse de la β-galactosidase et sur la multiplication du bactériophage T_2 chez Escherichia coli. C. R. Acad. Sci., Paris, 1951, t. 233, No. 20, p. 1230—1232.
Jakobovits J., Wiggins E. H. and Harrison J. S. The effect of optically active forms of some amino-acids on the response of yeast to β-alanine and pantothenic acid. J. Gen. Microbiol., vol. 5, No. 4, p. 648—656.
Jefferson W. E., Foster J. W., Phares E. F. and Carson S. F. Formate as a precursor of carboxylic acids in fungi. J. Amer. Chem. Soc., 1952, vol. 74, No. 6, p. 1477—1478.

Jerne N. K. Bacteriophage inactivation by antiphage serum diluted in distilled water. Nature, Lond., 1952, vol. 169, No. 4290, p. 117—118.
Johns A. T. The mechanism of propionic acid formation by Clostridium propionicum J. Gen. Microbiol., 1952, vol. 6, No. 1/2, p. 123—127.
Juni E. Mechanisms of formation of acetoin by bacteria. J. Biol. Chem., 1952, vol. 195, No. 2, p. 715—726.
Juni E. Mechanisms of the formation of acetoin by yeast and mammalian tissue. J. Biol. Chem., 1952, vol 195, No. 2, p. 727—734.
Kameda Y., Toyoura E., Kimura Y. and Yamazoe H. Hydrolysis and metabolism by soil bacteria of benzoyl-D-phenylalanine. Nature, Lond., vol. 169, No. 4311, p. 1016.
Katchalski E., Bichovski-Slomnitzki L. and Volcani B. E. Action of some water-soluble poly-α-mino-acids on bacteria. Nature, Lond., 1952, vol. 169, No. 4313, p. 1095—1096.
Kaushal R., Walker T. K. and Drummond D. Observations on the formation and structure of bacterial cellulose. Biochem. J., 1952, vol. 50, No. 1, p. 128—132.
Kayser F., Besson S. et Ehrwein A. Sur le métabolisme azoté et carboné de Escherichia coli en présence de sulfanilamide seul ou associé au phenol. C. R. Soc. Biol., Paris, 1951, t. 145, No. 13—14., p. 1094—1096.
Kayser F. et Pouteau-Thouvenot M. Action de la sulfanilamide du phénol et de l'association de ces deux substances sur la croissance et la respiration d'Escherichia coli. Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 1951, vol. 33, No. 11—12, p. 1726—1730.
Kayser F. et Pouteau-Thouvenot M. Activité respiratoire, activité reproductrice et teneur en phosphore de bactéries provenant d'un milieu de culture sulfamide. Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 1951, vol. 33, No. 11—12, p. 1718—1725.
Kayser F., Pouteau-Thouvenot M. et Prévot A. R. Etude de quelques désaminations réalisées par Esch. coli en présence de sulfanilamide associée ou non au phénol. Bull Soc. Chim. Biol., Paris, 1951, vol. 33, No. 11—12, p. 1731—1739.
Kearney E. B. The interaction of yeast flavokinase with riboflavin analogues. J. Biol. Chem., 1952, vol. 194, No. 2, p. 747—754.
Khouvine M. Y. et. Robichon-Szulmajster H. de.Ribonucléoprotéides de la levure de boulangerie. I. Extraction et purification des nucléoprotéides. Analyse des hydrolysats protéiques. Bull. Soc. Chim. Biol. Paris, 1951, vol. 33, No. 10, p. 1508—1517.
Kilby B. A. The formation of β-ketoadipic acid by bacterial fission of aromatic rings. Biochem. J., 1951, vol. 49, No. 5, p. 671—674.
King T. E. and Cheldelin V. H. Oxidative dissimilation of nonnitrogenous compounds in Acetobacter suboxydans, Nature, Lond., 1952, vol. 115, No. 2975, p. 14—15.
Kluyver A. J. and Zijp J. C. M. van. The production of homogentisic acid out of phenylacetic acid by Aspergillus niger. Antonie van Leeuwenhoek, 1951, vol. 17, No. 5, p. 315—324.
Koch A. L. Origin of phage purines. Federat. Proc., 1952, qol. 11, No. 1, part. 1, p. 241.
Koepsell H. J. and Tsuchiya H. M. Enzymatic synthesis of dextran. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 2, p. 293—295.
Kohanyi G. et Dedonder R. Produits intermédiaires dans la synthése des lèvanes par des extraits enzymatiques de Bacillus subtilis. C. R. Acad. Sci., Paris, 1951, t. 233, No. 19, p. 1142—1144.
Kosker O., Esselen W. B. and Fellers C. R. Effect of allyl isothiocyanate and related substances on the thermal resistance of Aspergillus niger, Saccharomyces ellipsoideus, and Bacillus thermoacidurans. Food Res., 1951, vol. 16. No. 6, p. 510—514.
Kozloff L. M. Biochemical studies of virus reproduction. IV. The breakdown of bacteriophage T_6r^+. J. Biol. Chem., 1952, vol. 194, No. 1, p. 83—94.
Kozloff L. M. Biochemical studies of virus reproduction. VII. The appearance of parent nitrogen and phosphorus in the progeny. J. Biol. Chem., 1952, vol. 194. No. 1, p. 95—108.
Krehl W. A. and Liag S. J. Nutrition of bacteria and fungi. Ann. Rev. Microbiol., 1951, vol. 5, p. 121—138.
Kuehner C. C. The effect of added B-vitamins on the growth and ester production of Hansenula anomala (Hanson) Sydow. Mycologia, 1951, vol. 43, No. 4, p. 389—401.
Kunitz M. Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from baker's yeast. J. Gen. Physiol., 1952, vol. 35, No. 3, p. 423—450.
Labaw L. W. The origin of phosphorus in T_5 bacteriophage of Escherichia coli. Proc. nation. Acad. Sci., Wash., 1951, vol. 37, No. 11, p. 721—725.
Lagerborg V. and Clapper W. E. Aminoacid decarboxylases of lactic acid bacteria. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 3, p. 394—397.
Lamanna A., Pasquinelli F. e Calzolabi G. L'influenza della arginina sul

metabolismo del glucosio del glucosio nello Staphylococcus albus. Bull. Soc. ital. Biol. speriment., 1951, vol. 27, f. 5, p. 755—757.
Lankford C. E., Hoyo H. and Litteringer J. F. Intracellular polysaccharide of Enterobacteriaceae. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 5, p. 621—626.
Lansford E. M. and Shive W. The microbiological activity oi N-(DL pantonyl)-β-alanine. J. Biol. Chem., 1952. vol. 194, No. 1, p. 329—336.
Lara F. J. S. and Stokes J. L. Oxidation of citrate by Escherichia coli. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 3, p. 415—420.
Larsen H. Photosynthesis of succinic acid by Chlorobium thiosulphatophilum. J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, No. 1, p. 167—173.
Laser H. Adaptation of Bacillus subtilis to fatty acids. Biochem. J., 1952, vol. 51, No. 1, p. 57—62.
Latarjet R. and Caldas L. R. Restoration induced by catalase in irradiated microorganisms. J. Gen. Physiol., 1952, vol. 35, No. 3, p. 455—470.
Latterade C. et Macheboeuf M. Actions de la pénicilline et de la streptomycine sur le catabolisme des ribonucléotides chez une bactérie aérobie Staphylococcus albus. Ann. Inst. Pasteur, 1954, t. 81, No. 6, p. 631—633.
Latterade-Auger C. et Macheboeuf M. Influence du ribonucléate de sodium sur la croissance d'une bactérie en présence et en l'absence de pénicilline. Ann. Inst. Pasteur, 1951, t. 81, No. 6. 634—641.
Launer H. F. and Fraenkel-Conrat H. The avidin-biotin equilibrium. J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, No. 1' p. 125—132.
Lees H. Hydroxylamine as an intermediate in nitrification. Nature. Lond., 1952, vol. 169, No. 4291, p. 156—157.
Lees K. A. and Tootill J. R. P. The assay of vitamin B_{12}. Relationship between growth response of Lactobacillus leichmanii 313 in tubes and diffusion of oxygen into the medium. Bioch. J., 1952, vol. 50, No. 4, p. 455—459.
Leijnse B. and Terpstra W. Experiments on the formation ot carboxylase and thiamine pyrophosphate in living baker's yeast. Biochim. Biophys. Acta, 1951, vol. 7, No. 4, p. 574—577.
Lein J., Appleby D. C. and Lein P. S. Acetate formation in Neurospora studied with biochemical mutants. Arch. Biochim. Biophys., 1951, vol. 34, No. 1, p. 72—80.
Lembke A., Kaufmann W. und Lagoni H. Über die Reduktion von Methylenblau durch Bakterien. Naturwiss., 1951, Jg. 38, H. 24, S. 563.
Lembke A., Kaufmann W., Lagoni H. und Gantz H. Zur chemischen Reaktivierung von Bakterien. Naturwiss., 1952, Jg. 39, H. 5, S. 112.
Lemoigne M., Somer A. et Croson M. Action, en anaérobiose, d'un bacille aérobie strict (B. megatherium) sur l'acide nitrique, l'acide nitreux et l'hydroxylamine. Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 1951, t. 33, No. 10, p. 1423—1436.
Levy L. and Coon M. J. Histidine synthesis in yeast and human liver. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part 1, p. 248.
Ley J. de and Vandamme M. The formation of the semiadaptive saccharase in yeast. Enzymologia, 1951, vol. 14, fasc. 6, p. 329—339.
Lichstein H. C. and Boyd R. B. The effect of oleic acid and of biotin on the formic hydrogenlyase and formic dehydrogenase enzyme systems. J. Bact., 1951, vol. 62, No. 4, p. 415—423.
Lindeberg G. and Malmgren H. Enzymatic breakdown of polymetaphosphate. VI. Influence of nutritional factors on the polymetaphosphatase production of Aspergillus niger. Acta Chem. Scand., 1952, vol. 6, No. 1, p. 27—37.
Lindegren C. C. and Palleroni N. J. Absence of the pre-adaptive utilization of galactose by yeasts. Nature, Lond., 1952, vol. 169, No. 4308, p. 879—880.
Loefer J. B., Bieberdorf F. W. and Weichlein R. G. Inhibition and enchancement of the growth of fungi with streptomycin. Bull. Torrey Bot. Club, 1952, vol. 79, No. 3, p. 242—250.
Lominski I., Morrison R. B. and Porter I A. Formation of citrulline by Staphylococcus aureus in an arginine-containing medium. Biochem. J., 1952, vol. 51, No. 3, p. XVII.
Lulla B. S. Studies in bacterial amylase. III. Influence of the concentration of the cultural nutrients on the formation of bacterial amylase. Biochim. Biophys. Acta, 1951, vol. 7, No. 2, p. 244—250.
Lwoff A., Jacob F., Ritz E. et Gagé M Induction de la production de bactériophages et d'une colicine par les peroxydes, les éthyléneimines et les halogénoalcoylamines. C. R. Acad. Sci., Paris, 1952, t. 234, No. 23, p. 2308—2310.
Lynch V. H. and Calvin M. Carbon dioxide fixation by microorganisms. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 4, p. 525—531.
Maaloe O. and Stent G. S. Radioactive phosphorus tracer studies on the reproduction of T_4 bacteriophage. I. Intracellular appearance of phage-like material. Acta Pathol. Scand., 1952, vol. 30, No. 2, p. 149—157.
Maas W. K. Pantothenate studies. II. Evidence from mutants for interference by salicylate with pantoate synthesis. J. Bact., 1952, vol. 63, No. 2, p. 227—232.
Mackal R. P. and Kozloff L. M. Transfer of N and P from parent T_7 bacteriophage to its progeny. Federat Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part. 1, p. 252.

MacLeod R. A. Observations on the synthesis and destruction of tyrosine by Streptococcus faecalis R. Arch. Biochem. Biophys., 1951, vol 33, No. 3, p. 465—471.
Magasanik B. The pathway of inositol fermentation in Aerobacter aerogenes. J. Amer. Chem. Sos., 1951, vol. 73, No. 12, p. 5919.
Magasanik B., Franzl R. E. and Chargaff E. The stereochemical specificity of the oxidation of cyclitols by Acetobacter suboxydans. J. Amer. Chem. Society, 1952, vol. 74. No. 10, p. 2618—2621.
Manson L. A. and Lampen J. O. The metabolism of desoxyribose nucleosides in Escherichia coli. J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, No. 2, p. 539—547.
Marnay Ch. Recherches sur l'action de l'acide p-hydroxybenzoique sur le coli-bacille. Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 1951, t. 33, No. 9, p. 1304—1306.
Marr A. G. and Wilson J. B. Fixation of $C^{14}O_2$ in amino acids by Brucella abortus. Arch. Biochem. Biophys., 1951, vol. 34, No. 2, p. 442—448.
Martin J. P. and Harding R. B. Comparativs of two bacterial growth preventives, acid (pH 4) and rose bengal plus streptomycin, on the nature of soil fungi developing on dilution plates. Soil Sci. Soc. Amer., Proc., 1951, vol. 15, p. 159—162.
Matsusnima Y. and Shimazu Y. Formation of 2,3-butylene glucol in bacterial fermentation of D-glucosamine. Science, 1952, vol. 115, No. 2992, p. 499.
Matthews R. E F. Effect of purines on the multiplication of plant viruses. Nature, Lond., 1952, vol. 169, No. 4299, p. 500—501.
Meeuse B. J. D. A note on the presence of β-amylase in moulds. J. exp. Bot., 1952, vol. 3, No. 7, p. 52—58.
Meyerhof O. and Davidson H. M. Pasteur effect in yeast lacking cytochrome oxidase. Federat. Proc., 1952, vol. 11, No. 1, part 1, p. 258—259.
Meyerhof O. and Ohlmeyer P. Purification of adenosinetriphosphatase of yeast. J. Biol. Chem., 1952, vol. 195, No. 1, p. 11—17.
Milhaud G., Aubert J.-P. et Cavard R. Synthèse de l'acetoine par un extrait enzymatique de Bacillus subtilis. C. R. Acad. Sci., Paris, 1952, t. 234, No. 20, p. 2026—2028.
Miller H. K. and Waelsch H. Utilization of glutamine and asparagine and their peptides by micro-organisms. Nature, Lond., 1952, vol. 169, No. 4288 p. 30—31.
Miller H. K. and Waelsch H. The utilization of glutamine and aspargine peptides by microorganisms. Arch. Biochem. Biophys., 1952, vol. 35, No. 1, p. 184—194.
Mitchell P. and Moyle J. The glycerophospho-protein complex envelope of Micrococcus pyogends. J. Gen. Microbiol., 1951, vol. 5, No. 5, p. 981—992,
Mithell P. and Moyle J. Isolation of hydrolytic products of a glycerophospho-compound from Micrococcus pyogenes. J. Gen. Microbiol., 1951, vol. 5, No. 5, p. 966—980
Mitbander V. B. and Sreenivasan A. Influence of xanthine on biogenesis of folic acid by Lactobacillus arabinosus. Current Sci., 1951, vol. 20, No. 5, p. 129.
Molho D. et Molho-Lacroix L. Etude comparée de l'accoutumance de Escherichia coli à la chloromycétine et à la dl-sérine. C. R. Acad. Sci., Paris, 1951, t. 233, No. 22, p. 1395—1397.
Molho-Lacroix L. et Molho D. Spécificité enzymatique dans la destruction de l'activité de la chloromycetine par E. coli au cours de l'accoutumance à l'antibiotique. Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 1952, t. 34. No. 1/2, p. 93—98.
Monod J., Cohen-Bazire G. et Cohn M. Sur la biosynthèse de la β-galactosidase (lactase) chez Escherichia coli. La spécificité de l'induction. Biochim. Biophys. Acta, 1951, vol. 7, No. 4, p. 585—599.
Monsour V. and Colmer A. R. The action of some members of the genus Serratia on egg yolk complex. J. Bact., 2952, vol. 63, No. 5, p. 597—603.
Muggleton P. W. and Webb M. The exocellular bacteriolytic system of soil actinomyces. III. The separation and characterisation of the proteolytic enzymes. Biochim. Biophys. Acta, 1952, vol. 8, No. 5, d. 526—536.
Mukherjee S. Studies on degradation of fats by microorganisms. I. Preliminary investigations on enzyme systems involved in the spoilage of fats. Arch. Biochem. Biophys., 1951, vol. 33, No. 3, p. 364—376.
Mukherjee S. Studies on degradation of fats by microorganisms. II. The mechanism of formation of ketones from fatty acids. Arch. Biochem. Biophys., 1952, vol. 35, No. 1, p. 28—33.
Mukherjee S. Studies on degradation of fats by microorganisms. III. The metabolism of butyric acid by A. niger. Arch. Biochem. Biophys., 1952, vol. 35, No. 1, p. 34—59.
Murphy D. A study on the possible production of glycerol from sulphite waste liquor by yeast. Canad. J. Technol., 1951, vol. 29, No. 11, p. 471—478.

(Продолжение см. т. XXII, № 5)

ХРОНИКА

ЗАСЕДАНИЕ, ПОСВЯЩЕННОЕ ПАМЯТИ В. Л. ОМЕЛЯНСКОГО

21 апреля 1953 г. исполнилось 25 лет со дня смерти выдающегося русского микробиолога академика Василия Леонидовича Омелянского. Институтом микробиологии Академии наук СССР, Московским ордена Ленина государственным университетом им. М. В. Ломоносова и Московским обществом испытателей природы было организовано заседание, посвященное памяти этого крупного ученого. Заседание состоялось 21 апреля 1953 г. в Большой зоологической аудитории Московского государственного университета.

Открывая собрание, чл.-корр. АН СССР А. А. Имшенецкий отметил выдающиеся заслуги В. Л. Омелянского в деле развития русской микробиологии, указал на большой вклад в отечественную науку, сделанный В. Л. Омелянским его исследованиями по разложению целлюлозы, по круговороту азота, брожению пектиновых веществ, образованию метана микроорганизмами и по геологической деятельности микроорганизмов.

Особенное значение в деле воспитания кадров русских микробиологов сыграли книги В. Л. Омелянского «Основы микробиологии» и «Практическое руководство по микробиологии». Эти труды, являясь непревзойденными по стилю изложения, вместе с тем столь полно и систематично излагают вопросы микробиологии и личный опыт В. Л. Омелянского в разрешении различных задач этой науки, что и в настоящее время они являются настольными книгами всех советских микробиологов.

С подробным докладом о жизни и научной деятельности В. Л. Омелянского выступила его бывшая сотрудница доктор биологических наук Л. Д. Штурм. Подробно изложив биографию В. Л. Омелянского, Л. Д. Штурм остановилась на его классических исследованиях по анаэробному разложению клетчатки, нитрификации и фиксации атмосферного азота. В своем обстоятельном докладе Л. Д. Штурм отметила многогранную и разностороннюю деятельность В. Л. Омелянского как крупного ученого, общественного деятеля и талантливейшего популяризатора науки, создавшего целую серию высоконаучных и увлекательных по изложению произведений.

Совместный доклад А. А. Имшенецкого и Е. Л. Рубан «Выделение чистых культур нитрифицирующих бактерий и их биология» явился как бы продолжением того раздела доклада Л. Д. Штурм, в котором она излагала работы Омелянского по нитрификации. Авторы подтвердили положения Омелянского и Виноградского о морфологии и биологии нитрифицирующих микроорганизмов. Докладчики предложили новые методы выделения чистых культур нитрификаторов, с успехом примененные ими на практике.

С заключительным докладом выступил проф. В. Н. Шапошников. В своем сообщении «Открытие В. Л. Омелянским Bact. formicum и роль муравьиной кислоты в обмене веществ микроорганизмов» он остановился на исключительном значении этого открытия для развития проблемы автотрофии. В. Н. Шапошников указал, что в настоящее время в Институте микробиологии АН СССР ведутся работы с Bact. formicum и другими микроорганизмами, способными усваивать муравьиную кислоту. Использование муравьиной кислоты, этого органического соединения, ближе всего стоящего по своему составу к углекислоте, в конструктивном обмене микроорганизмов, позволяет нам расширить и углубить представления об автотрофии и автотрофных микроорганизмах.

Е. Рубан

Московская ордена Ленина с.-х. академия им. К. А. Тимирязева объявляет конкурс на соискание учрежденных правительством СССР ежегодных всесоюзных премий имени академика В. Р. Вильямса.

Ежегодные всесоюзные премии имени академика В. Р. Вильямса присуждаются за выдающиеся работы в области почвоведения и земледелия.

Премии установлены в следующих размерах:

1-я премия 5.000 рублей

2-я премия 3.000 рублей

3-я премия 1.500 рублей

На конкурс принимаются работы, законченные в 1952 и 1953 г. в рукописях или опубликованные в печати.

Для участия в конкурсе необходимо представить:

1. 2 экземпляра рукописи работы (в переплете) или 2 экземпляра изданной работы.

2. Личный листок соискателя.

3. Автобиографию соискателя.

4. Характеристику с места работы.

Материалы следует направлять на имя директора академии по адресу.

Москва, 8, Новое шоссе, д. 51. Тимирязевская сельскохозяйственная академия, корпус 10.

В конкурсе могут принимать участие научные работники, специалисты и практики сельского хозяйства.

Срок конкурса до 1 октября 1953 года.

ИЗВЕЩЕНИЕ

Центральным архивным управлением издана «Опись личного фонда И. В. Мичурина», 1952 г. Объем 9 п. л. Цена 6 рублей 30 коп.

«Опись личного фонда И. В. Мичурина» раскрывает содержание документального наследства великого преобразователя природы. В опись внесены сведения о документах биографического характера, о разносторонней общественно-политической и научно-исследовательской деятельности И. В. Мичурина по выведению новых сортов плодово-угодных растений, об их распространении, а также об организации и деятельности питомника его имени.

Заказы на опись следует направлять в Научно-издательский отдел Центрального архивного управления по адресу: Москва, 48, Б. Пироговская ул., д. 17. Тел. Г-6-45-00 доб. 9, 58.

Научно-издательский отдел
Центрального архивного управления

СОДЕРЖАНИЕ

А. А. Имшенецкий. Памяти В. Л. Омелянского 361
Л. Д. Штурм. В. Л. Омелянский. Его жизнь и научная деятельность (Краткий очерк) 363

Экспериментальные статьи

А. А. Имшенецкий и Е. Л. Рубан. Получение чистых культур Nitrosomonas 376
М. Н. Мейсель и Н. П. Трофимова. Новый микробиологический метод определения триптофана 385
С. А. Баринова. Влияние углекислоты на рост плесневых грибов 391
Л. К. Осницкая. Распространение гнилостных, тионовокислых, метанокисляющих и водородокисляющих бактерий в грунтах Северного Каспия . . 399
Е. Н. Мишустин. О распространении азотобактера в почвах 408
И. Л. Работнова и Г. С. Родионова. Обогащение субстрата азотистыми веществами при развитии Azotobacter Beijerinckii 415
Е. А. Штерн. Серологическая характеристика клубеньковых бактерий. I. . . 423
Н. С. Авдонин и Ю. А. Худякова. Гранулы для азотобактера 431
А. В. Рыбалкина и Е. В. Кононенко. Непосредственное наблюдение микрофлоры в почве модифицированным методом Холодного 439
Н. П. Крючкова. О выживаемости микроорганизмов в лечебных грязях . . 445
Е. Н. Дерябина. Получение фагорезистентных штаммов молочнокислых стрептококков с ценными для производства свойствами 452

Обзоры

Н. Б. Нечаева. Образование метана микроорганизмами 456

Рефераты

Общая микробиология, морфология, физиология и биохимия 472

Критика и библиография

Н. С. Егоров.—И. Г. Шиллер. Направленный антагонизм микробов . . . 480
Библиография (Иностранная литература 1951—1952 гг.) 485

Хроника

Е. Л. Рубан. Заседание, посвященное памяти В. Л. Омелянского. 495

12

Т-04859 Подписано к печати 18.VII. 1953 г. Печ. л. 11,65+3 вклейки
Уч.-изд. л. 14,8 Формат бум. 70×108 1/16 Бум. л. 4 1/4 Тираж 5850 экз. Зак. 1413

2-я типография Издательства Академии наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10

Цена 12 руб.